

SÉRIE A

N° DE SÉRIE: 324

N° D'ORDRE: 348

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Robert-Francis FERON

1^{re} THÈSE. — HYDROLYSE DIASTASIQUE DES FRUCTO-POLYOSIDES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 22 JUILLET 1936 devant la Commission d'examen.

Président : MM. JAVILLIER

Examineurs : { VAVON
AUBEL

IMPRIMERIE DE PERSAN-BEAUMONT

80, Avenue Wilson, 80

PERSAN (S.-&-O.)

SÉRIE A

N° DE SÉRIE: 324

N° D'ORDRE: 348

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Robert-Francis FERON

1^{re} THÈSE. — HYDROLYSE DIASTASIQUE DES FRUCTO-
POLYOSIDES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le Juin 1936 devant la Commission d'examen.

Président : MM. JAVILLIER

Examineurs : { VAVON
 AUBEL

IMPRIMERIE DE PERSAN-BEAUMONT

80, Avenue Wilson, 80
PERSAN (S.-&-O.)

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire M. MOLLIARD.
Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

<i>Professeurs honoraires</i>	}	H. LE CHATELIER.	LÉON BRILLOUIN.	AUGER.
		H. LEBESGUE.	GOURSAT.	BLAISE.
		A. FERNBACH.	WALLERANT.	DANGEARD.
		A. LEDUC.	GUILLET.	JANET.
		Emile PICARD.	PÉCHARD.	LESPIEAU.
		Rémy PERRIER.	FREUNDLER.	MARCHIS.
				VESSIOT.

PROFESSEURS

G. BERTRAND... T Chimie biologique.	ROBERT-LÉVY .. Zoologie.
M. CAULLERY... T Zoologie (Evolution des êtres organisés).	F. PICARD..... Zoologie (Evolution des êtres organisés).
G. URBAIN..... T Chimie générale.	Henri VILLAT... T Mécanique des fluides et applications.
Emile BOREL... T Calcul des probabilités et Physique math.	Ch. JACOB..... T Géologie.
Jean PERRIN... T Chimie physique.	P. PASCAL..... T Chimie minérale.
H. ABRAHAM... T Physique.	M. FRÉCHET... T Calcul différentiel et Calcul intégral.
E. CARTAN..... T Géométrie supérieure.	E. ESCLANGON... T Astronomie.
M. MOLLIARD... T Physiologie végétale.	M ^{me} RAMART-LUCAS T Chimie organique.
L. LAPICQUE... T Physiologie générale.	H. BÉGHIN..... T Mécanique physique et expérimentale.
A. COTTON..... T Recherches physiques.	FOCH Mécanique expérimentale des fluides.
J. DRACH..... T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	PAUTHENIER ... Physique (P. C. B.).
Charles FABRY. T Enseignem. de Phys.	DE BROGLIE.... T Théories physiques.
Charles PÉREZ. T Zoologie.	CHRÉTIEN Optique appliquée.
Léon BERTRAND T Géologie structurale et Géologie appliquée.	P. JOB..... Chimie générale.
P. PORTIER.... T Physiologie comparée.	LABROUSTE Physique du Globe.
E. RABAUD.... T Biologie expériment. Chimie minérale.	PRENANT Zoologie.
M. GUICHARD... T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	VILLEY Mécanique physique et expérimentale.
Paul MONTEL... T	BOHN Zoologie (P. C. B.).
P. WINTREBERT T Anatomie et histologie comparées.	COMBES Botanique (P. C. B.).
L. BLARINGHEM. T Botanique.	GARNIER T Mathématiques génér.
O. DUBOSQ.... T Biologie maritime.	PÉRÈS Mécanique des fluides.
G. JULIA..... T Mécanique analytique et Mécan. céleste.	HACKSPILL Chimie (P. C. B.).
A. MAUGUIN... T Minéralogie.	LAUGIER Physiologie générale.
A. MICHEL-LÉVY T Pétrographie.	TOUSSAINT Technique Aéronaut.
H. BÉNARD.... T Mécanique expérimentale des fluides.	M. CURIE..... Physique (P. C. B.).
A. DENJOY.... T Application de l'analyse à la Géométrie.	G. RIBAUD.... T Hautes températures.
L. LUTAUD.... T Géographie physique et géologie dynamique.	CHAZY T Mécanique rationnelle.
Eugène BLOCH. T Physique théorique et Physique céleste.	GAULT Chimie (P. C. B.).
G. BRUHAT.... Physique.	CROZE Recherches physiques.
E. DARMOIS... Enseign. de Physique.	DUPONT T Théories chimiques.
A. DEBIERNE... T Physique générale et Radioactivité.	LANQUINE Géologie.
A. DUFOUR.... T Physique (P. C. B.).	VALIRON Mathématiques génér.
L. DUNOYER... Optique appliquée.	BARRABÉ Géologie structurale et Géologie appliquée.
A. GUILLIERMOND T Botanique.	MILLOT Zoologie (P. C. B.).
M. JAVILLIER... Chimie biologique.	F. PERRIN.... Théories physiques.
L. JOLEAUD.... Paléontologie.	VAVON Chimie organique.
	G. DARMOIS... Calcul des Probabilités et Physique. Mathématique.

Secrétaire A. PACAUD.
Secrétaire honoraire D. TOMBECK.



A MA MERE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

Les premières recherches sur l'hydrolyse diastasique des fructosides ont porté sur l'inuline, qui est connue depuis plus d'un siècle, soit qu'on ait étudié sa dégradation dans les jus naturels, soit qu'on ait essayé de la faire fermenter sous l'action de différentes levures.

Dès 1888, GREEN [1] étudiait la saccharification de l'inuline dans le suc de l'artichaut de Jérusalem (topinambour). Plus tard, au cours de ses recherches approfondies sur la constitution de l'inuline, TANRET [2] ne manqua pas de la soumettre, en vain du reste, à l'action des levures usuelles. Vers la même époque, BOURQUELOT [3] signalait l'hydrolyse assez facile de l'inuline par le liquide fermentaire d'*Aspergillus niger*.

La liste des fructopolyosides ne comprenait à cette date, en dehors des satellites de l'inuline isolés également par TANRET, que l'irisine, la scilline, la graminine, la triticine préparés respectivement par WALLACH (1888), SCHMIEDEBERG (1879), ERKSTRAND et JOHANSON (1887), WEYER VON REIDEMEISTER (1880). Ceux de ces auteurs qui s'étaient préoccupés de l'action des diastases s'étaient bornés à des essais de fermentation.

A mesure que ces corps furent préparés avec plus de soin et qu'on en eut isolé de nouveaux, on se préoccupa davantage de leur hydrolyse diastasique. Les satellites de l'inuline furent étudiés de ce point de vue par

H. COLIN [4] (1920), l'irisine d'*Iris pseudacorus* et les fructosanes d'*Iris foetidissima* par AUGEM [5] (1928), la graminine et la tricitine par DE CUGNAC [6] (1930), l'asphodéloside par NEYRON DE MEONS [7] (1930), les lycorosides par BELVAL [8] (1933). Plus récemment H. COLIN et M^{lle} A. CHAUDUN [9] ont décrit l'hydrolyse diastasique de la synanthrine et J. CARLES [10] celle de plusieurs fructosides nouveaux retirés des iris.

D'une façon générale, on peut dire que plusieurs de ces fructosides tels que l'inuline, l'irisine, la triticine se laissent difficilement attaquer par les préparations ordinaires de sucrase de levure, tandis que d'autres se prêtent plus facilement à la saccharification par ces mêmes milieux fermentaires.

Mais avec les progrès de la technique diastasique, il devint nécessaire de donner des précisions sur le mode de préparation des milieux fermentaires: suivant qu'on s'adresse à une race de levure ou à une autre, suivant qu'on emploie les macérations rapides de levure ou les autolysats de longue durée en présence d'un antiseptique ou d'un autre, les milieux fermentaires agissent de façon bien différente sur l'inuline et les autres fructosides.

Si l'on considère plus spécialement ceux des fructosides qui sont hydrolysés par les extraits de levure avec le plus de facilité, on est porté à se demander si l'on doit rapporter leur hydrolyse à la saccharase elle-même. A s'en tenir à la définition classique de l'invertine, c'est-à-dire à la considérer comme le ferment qui se porte sur la liaison fructose-glucose telle qu'elle existe dans le saccharose et dont l'action se traduit par le décrochement du fructose, quel que soit le reste de la molécule;

on est bien forcé d'admettre une ou plusieurs fructosidases capables d'hydrolyser les liaisons fructose-fructose du graminolosite par exemple.

Mais alors, pour peu qu'on applique les méthodes classiques concernant la spécificité des diastases, on sera conduit à admettre l'existence d'un grand nombre de fructosidases. C'est contre quoi réagissent certaines publications très récentes qui attribuent l'hydrolyse du saccharose et celle des fructosides à une seule et même fructosidase.

Le problème se complique encore de ceci, que certains fructosides livrent à l'hydrolyse uniquement du fructose et d'autres un mélange de glucose et de fructose. En général, ces derniers sont plus solubles et plus facilement hydrolysables. Néanmoins il y a des exceptions, la graminine par exemple, qui ne renferme pas de glucose et qui est un des fructosides que les levures hydrolysent le plus facilement.

*
**

Nous nous sommes proposés d'étudier systématiquement l'hydrolyse d'un certain nombre de fructosides parmi les plus typiques, en nous adressant comme source de ferment aux macérations de levure préparées dans des conditions bien déterminées et les plus diverses.

Nous avons pu constater, dès le début, que l'inuline, contrairement à l'opinion admise, n'est pas indifférente à l'action de l'autolysat de levure. Ce résultat a d'ailleurs été annoncé pendant l'exécution du présent travail par un chimiste allemand, Rudolf WEIDENHAGEN.

Nous avons d'abord étudié en détail la préparation de quelques invertines, notamment celles des autolysats

de levure. Vient ensuite l'exposé des résultats concernant l'hydrolyse, par ces préparations, de l'inuline et d'une dizaine d'autres polyosides. Enfin, dans un troisième chapitre, nous avons discuté, à la lumière de nos observations personnelles et aussi des publications les plus récentes, le problème de la spécificité des fructosidases.

*
**

Tous les polyosides dont il est question au cours de ce travail sont des *holosides*, c'est-à-dire que, suivant la nomenclature usitée aujourd'hui, leur molécule ne comporte pas de reste aglucosique. En conséquence, il eut été plus conforme aux règles de nomenclature de les désigner sous le nom de *polyfructo-holosides*, ou même, plus simplement, *fructo-holosides*. Mais ce dernier terme prête à confusion, l'interprétation étymologique pouvant conduire à considérer ces corps comme formés uniquement de *fructose*. C'est pourquoi nous avons préféré le nom de *fructo-polyosides*, et même, par abréviation, *fructosides*.

Nous avons conservé, pour un certain nombre de ces corps, le nom ancien sous lequel ils sont généralement connus: *inuline*, *graminine*, etc. Ce sont des préoccupations de simplicité qui nous ont amenés à préférer ces termes à ceux auxquels conduit la nomenclature en vigueur: *inulose*, etc.

*
**

M. le Professeur JAVILLIER a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse ; qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance. J'adresse également mes sentiments de pro-

fonde gratitude à MM. les Professeurs VAVON et AUBEL, qui ont bien voulu accepter de faire partie de ce jury.

Nous devons à notre maître, M. l'abbé H. COLIN, professeur à l'Institut Catholique, d'avoir pu mener à bien ces recherches. Il n'a cessé de nous prodiguer ses conseils éclairés et une affectueuse sollicitude. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Notre gratitude va aussi à nos camarades du Laboratoire de physiologie végétale de l'Institut Catholique, dont les conseils et l'amicale assistance nous ont été d'un précieux secours.

TECHNIQUES

Nous avons suivi la marche des hydrolyses en faisant le rapport du réducteur formé au réducteur total, dosé après action de l'acide chlorhydrique.

Les dosages de sucre réducteur ont été effectués suivant la méthode de Gabriel BERTRAND ; les filtres d'amiante doivent être changés assez fréquemment, les préparations diastasiques fournissant au sein des solutions à hydrolyser un léger précipité qui colmate le filtre.

Nous avons constamment effectué nos hydrolyses diastasiques sous la protection d'un antiseptique, généralement le toluène. Celui-ci forme au-dessus du liquide une couche protectrice. Pour éviter l'évaporation, les tubes étaient bouchés au liège et paraffinés.

La mesure du pH a été effectuée par la méthode colorimétrique, soit à l'aide d'une gamme étalon, soit par la méthode de FELTON, qui, ne nécessitant que quelques gouttes de solution, nous a rendu de grands services lorsque nous utilisions des produits rares. Les indicateurs employés étaient : pour les pH aux environs de 4,5 le rouge de méthyle et le bleu de bromophénol, pour les pH aux environs de 7,0 le bleu de bromothymol.

L'inuline est théoriquement très peu soluble à froid. Pratiquement, la sursaturation nous a toujours permis d'effectuer nos hydrolyses avec des solutions à environ

2 p. 100 sans que l'inuline se dépose de façon notable, surtout à 37°.

Il va sans dire que pour chacune de nos expériences, nous avons fait deux témoins: l'un sans inuline, l'autre avec une liqueur diastasique préalablement portée dix minutes au bain-marie bouillant. Nous avons cru inutile de le signaler chaque fois.

D'autre part, chaque résultat a été établi par plusieurs essais. Pour ne pas encombrer ce travail, déjà chargé en tableaux, nous n'avons publié que les résultats d'un seul, représentant autant que possible l'allure moyenne de l'hydrolyse. Les écarts entre les différents essais sont d'ailleurs faibles.

*
**

Pour séparer les diverses propriétés diastatiques d'un même milieu fermentaire, trois méthodes s'offrent à nous: la méthode de comparaison, la méthode de destruction partielle, et la méthode de V. HENRI et LARGUIER DES BANCELS, dite « méthode des vitesses de réaction ».

Il s'agissait pour nous de séparer la diastase hydrolysant le saccharose, de celles qui hydrolysent l'inuline et les autres fructosanes. La méthode des vitesses de réaction est inapplicable, la lenteur de l'hydrolyse des fructo-polyosides comparativement à celle du saccharose, sous l'action des mêmes milieux, étant telle que tout le saccharose est hydrolysé avant qu'une quantité décelable de polysaccharide ait été transformé.

La méthode de comparaison conduit à attribuer à chaque glucide une hydrolase spécifique, pour peu que l'on fasse intervenir plusieurs milieux fermentaires.

Nous avons eu, au cours de ce travail, l'occasion de l'employer fréquemment, mais nous ne tenons pour absolument certains que les résultats établis par la méthode de destruction partielle que nous préférons, comme plus rigoureuse, à la méthode de comparaison.

Différents moyens de destruction, ou mieux d'élimination fractionnée, peuvent être employés : chaleur, agents chimiques (alcool, déféquants) et agents physiques (adsorption, pH). Nous avons employé quelques-uns de ces moyens et notamment la chaleur ; les résultats obtenus sont très nets et faciles à reproduire, ce qui justifie amplement la préférence que nous avons accordée à la méthode.

CHAPITRE PREMIER

PREPARATION DES PRODUITS FERMENTAIRES

I. — AUTOLYSATS DE LEVURE

On peut préparer très simplement des liqueurs très actives sur le saccharose en faisant macérer dans l'eau la levure de boulangerie ou de brasserie, en présence ou non d'un antiseptique. L'autolyse aseptique offre l'avantage de donner des préparations qu'on peut laisser en contact plus longtemps, et, partant, enrichir en ferments. Aussi bien sont-ce les autolysats en milieu aseptique qui nous ont donné les meilleurs résultats (1).

Généralement, nous employons une partie de levure pour une partie d'eau distillée, avec 1 p. 100 de toluène. Au bout d'un mois à six semaines, la préparation est déjà d'une activité notable vis-à-vis de l'inuline, activité qui, d'ailleurs, croît avec le temps, jusqu'à une limite, variable avec les préparations, et qui peut n'être atteinte qu'après un an de contact (2).

L'autolyse peut aussi être faite sans antiseptique, par putréfaction ménagée de la levure. On emploiera alors

(1) Consulter à ce sujet : H. COLIN, *Les Diastases*, tome I, page 125 et suivantes.

(2) On notera que la préparation hydrolyse le saccharose dès le premier jour.

de l'eau de Seine au lieu d'eau distillée : la levure entre en fermentation dès les premiers jours. On a soin d'arrêter la putréfaction avant que la liqueur ne devienne alcaline. On peut alors filtrer et additionner le filtrat d'un peu de toluène : la solution conserve ainsi son activité pendant très longtemps.

Il n'est, d'ailleurs, besoin de filtrer que pour les emplois immédiats : à la longue, la liqueur s'éclaircit d'elle-même en laissant déposer un important précipité.

La filtration de telles préparations offre naturellement de grandes difficultés. La filtration sur le vide ne donne que des résultats médiocres : le filtre ne tarde pas à se colmater et la filtration est extrêmement lente. Le mieux est encore de filtrer sur papier filtre ordinaire : le filtrat est généralement encore opalescent ; une filtration ultérieure sur le vide donnera un liquide limpide, si l'on a eu soin d'étendre sur ce filtre une légère couche d'un mélange de Kieselguhr et d'amiante en poudre.

Les liqueurs ainsi obtenues se prêtent très bien aux lectures polarimétriques (1).

Influence des conditions d'autolyse

1° « *Concentration* » de l'autolysat. — Le pouvoir hydrolysant des préparations varie non seulement avec la durée de l'autolyse, mais encore avec les quantités relatives de levure et d'eau mises en œuvre.

Voici, par exemple, la marche de l'hydrolyse d'une solution d'inuline à 2 p. 100 pour trois autolysats :

(1) L'addition de toluène provoque généralement l'apparition d'une mousse et d'un précipité qui reste à la surface de séparation des deux liquides. Il suffit de prélever au-dessous de cette couche pour avoir des liqueurs claires.

Autolysat A: levure 1 partie, H²O 1 partie;

Autolysat B: levure 1 partie, H²O 3 parties.

Tous les deux après 27 jours d'autolyse.

On emploie également une dilution au tiers de l'autolysat A.

Les quantités respectives de solution d'inuline et de liqueur fermentaire, le pH, la température, sont rigoureusement identiques.

Réducteur % cm ³ après	Autolysat A	Autolysat A $\frac{1}{3}$	Autolysat B
5 jours	0,292 gr.	0,140 gr.	0,204 gr.
11 jours	0,640 »	0,366 »	0,480 »
19 jours	0,960 »	0,640 »	0,768 »
90 jours	1,780 »	1,570 »	1,820 »

Le pouvoir hydrolysant croît donc avec la quantité de levure employée, mais ne lui est pas proportionnel.

En outre, la quantité d'inuline hydrolysée dans un temps donné, n'est pas non plus proportionnelle à la quantité d'autolysat employée.

2° *La durée d'autolyse.* — L'âge de l'autolysat influence grandement son pouvoir hydrolysant: les autolysats « jeunes », c'est-à-dire ceux dont la durée d'autolyse est comprise entre 1 et 10 jours, sont à peu près dépourvus d'activité vis-à-vis de l'inuline. Le pouvoir hydrolysant n'apparaît que vers la deuxième semaine d'autolyse et croît à partir de ce moment. Voici, par exemple, le début de l'hydrolyse de l'inuline à l'aide de trois liqueurs de macération aseptique, l'une prélevée après 7 jours de contact, l'autre après 15 jours, la dernière après 48 jours. Il s'agit d'un autolysat de levure de

boulangerie (1 partie d'eau pour 1 partie de levure) sous toluène.

Le réducteur est dosé sur 5 cm³ de liqueur. Nous l'exprimons en milligrammes de cuivre réduit, pour les 5 cm³ de prise d'essai.

Dosage après	Autolysat de 7 jours	Autolysat de 15 jours	Autolysat de 48 jours
2 jours	1 mgr.	1 mgr.	12 mgr.
5 jours	5 »	7 »	25 »
13 jours	17 »	24 »	52 »

L'activité des deux premiers autolysats est donc très faible. Cependant, après deux mois d'autolyse, les mêmes liqueurs fermentaires avaient acquis un pouvoir hydrolysant comparable à ceux des autolysats que nous donnons comme exemples plus loin.

Il convient de noter également que si, dès le début les liqueurs sont actives sur le saccharose, leur activité croît aussi avec le temps.

Les deux premières liqueurs précédentes servent à l'hydrolyse d'une solution de saccharose à 10 p. 100, à raison de 1 cm³ pour 25 cm³ de solution. On abandonne à l'étuve à 37° exactement 1 heure. Deux lectures polarimétriques sont effectuées l'une avant, l'autre après le séjour à l'étuve et retour à la température ordinaire.

Autolysat	α initial	α final
De 2 jours.....	+ 12° 48'	+ 3° 16'
De 15 jours.....	+ 12° 22'	+ 0° 52'

Les mêmes liqueurs, après deux mois d'autolyse, donnent dans les mêmes conditions:

α initial: +12° 32' α final (1 h. à 37°): —2° 22'.

3° *Les antiseptiques et la température d'autolyse.* —

Il n'est pas indifférent d'effectuer l'autolyse en présence de tel antiseptique plutôt que de tel autre: c'est un fait connu que la présence d'un antiseptique déterminé « oriente » l'autolyse vers la production d'une diastase déterminée.

500 gr. de levure de boulangerie sont répartis en cinq parties égales et chaque fraction mise à macérer dans 100 gr. d'eau distillée sous la protection d'un antiseptique qui était soit le toluène, soit le chloroforme, soit le fluorure de sodium, tous les trois employés à la dose de 1 p. 100. En même temps, nous abandonnons à l'autolyse, sous toluène, les deux dernières portions: l'une à l'étuve à 37°, l'autre à la glacière, à une température oscillant entre 1° et 2° C.

Après dix jours, nous prélevons et filtrons quelques centimètres cubes de chaque liqueur et nous évaluons son activité sur le saccharose et sur l'inuline.

L'hydrolyse du saccharose est faite dans les conditions suivantes:

Saccharose 5 p. 100 environ.....	25 cm ³
Liqueur diastasique	1 cm ³

Une heure de séjour à l'étuve de 37°, puis retour à la température ordinaire. Lecture avant (α_1) et lecture après (α_2) le séjour à l'étuve.

Antiseptique	α_1	α_2	différence $\alpha_1 - \alpha_2$
Toluène	+6° 54'	+3° 28'	3° 26'
Chloroforme	+6° 56'	+2° 2'	4° 54'
Fluorure	+6° 40'	—0° 52'	7° 32'
Toluène à 37°	+6° 32'	+0° 40'	5° 52'
Toluène à 0°	+6° 56'	+0° 54'	6° 2'

L'hydrolyse de l'inuline a lieu dans les conditions suivantes:

Inuline, solution à 1 p. 100 env.	10 cm ³
Autolysat	2 cm ³
Toluène, quelques gouttes, température 37°, pH ajusté partout à 4,5.	

Dosage après 2 jours et après 7 jours sur 5 cm³ de la liqueur. Le réducteur est exprimé en milligrammes de cuivre réduit pour la prise d'essai.

Antiseptique	Réduction après 2 jours	Réduction après 7 jours
Toluène	0 mgr.	6 mgr.
Chloroforme	0 »	0 »
Fluorure	14 »	33 »
Toluène à 37°	1,5 »	4 »
Toluène à 0°	traces	11 »

Le fluorure de sodium favorise la production d'inulase dans une large mesure, et la température de 0° semble agir dans le même sens, bien que plus faiblement. Les différences observées ne tiennent pas à des différences de pH, puisque tous les essais ont été amenés à pH = 4,5. Il faut donc invoquer soit la production du ferment, soit encore l'action des antiseptiques examinés sur l'hydrolyse elle-même.

L'examen des mêmes autolysats, après cinq mois d'autolyse, confirme d'ailleurs ces conclusions.

L'activité sur le saccharose, mesurée comme plus haut, est devenue:

Antiseptique	α 1	α 2	différence α 1 — α 2
Toluène	+5° 18'	— 1°	6° 18'
Chloroforme	+5° 20'	— 0° 36'	5° 56'
Fluorure	+5° 20'	— 0° 40'	6°
Toluène à 37°	+5° 22'	— 0° 28'	5° 50'
Toluène à 0°	+5° 18'	— 0° 40'	5° 58'

De même vis-à-vis de l'inuline, l'activité était devenue (mgr. Cu²O sur 5 cm³ de prise d'essai) :

Antiseptique	Dosage après 2 jours	Dosage après 7 jours
Chloroforme	2 mgr.	17 mgr.
Fluorure	19 »	39 »
Toluène à 37°	0 »	10 »
Toluène à 0°	5 »	53 »

Nous retiendrons donc l'action favorisante du fluorure de sodium et de la température à 0°, ainsi que l'action défavorable du chloroforme et de l'autolyse à 37°.

Si la température atteint 50°, on constate que l'autolysat, actif au début sur le saccharose et sur l'inuline, perd rapidement son pouvoir hydrolysant vis-à-vis du fructose; c'est ce qui ressort des expériences suivantes :

Nous utilisons un autolysat composé d'une partie de levure pour une partie d'eau et âgé de neuf mois. Dans une étuve de Roux réglée plusieurs jours à l'avance à 50° C., nous chauffons l'autolysat par fractions de 10 cm³ pendant des temps croissants: 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures, 5 heures, puis 24 heures. Nous mesu-

rons alors l'activité des échantillons vis-à-vis du saccharose et de l'inuline.

L'activité vis-à-vis du saccharose est évaluée suivant la technique décrite plus haut.

Pour l'inuline, on emploie :

Inuline 3 p. 100 10 cm³
 Autolysat 1 cm³
 Toluène: quelques gouttes, température 37°,
 pH ajusté à 4,5.

Le réducteur est dosé sur 5 cm³ de liqueur après quatre jours, les résultats sont exprimés en milligrammes de Cu²O pour les 5 cm³ de prise d'essai.

Autolysat chauffé pendant —	Inuline Réducteur formé (mgr. Cu ² O) —	Saccharose	
		α initial	α final
non chauffé	49,6	+12° 32'	— 3° 8'
1 heure	34,15		
2 heures	28,98	+12° 28'	— 3° 10'
3 heures	19,66		
4 heures	18,63		
5 heures	13,45	+12° 44'	— 3° 20'
24 heures	3 »	+13° 10'	— 0° 28'

Ainsi, bien que l'activité vis-à-vis du saccharose ne soit pas diminuée, au moins dans les premières heures du chauffage (elle l'est à peine après 24 heures de séjour à 50°), l'activité vis-à-vis de l'inuline décroît dès la première heure de chauffage.

L'expérience, répétée maintes fois, nous a donné les mêmes résultats. Il semble bien qu'on ait séparé ici, par un moyen classique, l'inulase et la saccharase.

4° *Les différentes races de levure.* — De tous les facteurs qui influent sur la composition fermentaire de ce milieu si complexe qu'est l'autolysat de levure, il n'en est sans doute pas d'aussi important et cependant peu mentionné que l'origine de la levure mise en œuvre : levure de brasserie et levure de boulangerie diffèrent déjà notablement, levures hautes et levures basses encore davantage. Et que dire des nombreuses races de levures aussi différentes par leurs fonctions et leurs propriétés qu'elles le sont par leur morphologie ?

Dans tout notre travail, nous n'avons employé que deux sortes de levure, toutes deux des levures industrielles qui offrent le maximum de chances de constance dans la composition : la levure de boulangerie « Springer » et la levure de brasserie « Moritz ». Toutes deux nous ont donné, au fur et à mesure qu'avancait notre travail, des autolysats dont les propriétés étaient suffisamment comparables (1).

On ne saurait trop dire l'intérêt que présenterait une étude des levures du point de vue des ferments qu'elles abandonnent à l'autolyse. Cela pourrait permettre de préciser les conditions d'expérience et de mettre terme à un certain nombre de polémiques qui peut-être n'ont pas d'autre source que la diversité d'origine et de race des levures employées.

(1) Une seule fois nous avons livré à l'autolyse un échantillon d' « Alcoleuvre » des Etablissements F. L. S. A. de Saint-Ouen-l'Aumône; l'autolysat différait notablement de ceux que nous donnait la levure Springer, notamment en ce qui concerne l'activité vis-à-vis de l'inuline qui nous a paru inférieure.

PRODUITS MYCÉLIENS

(Poudres mycéliennes et liqueurs de macération)

Outre les macérations de levure, nous avons utilisé deux autres sources d'invertine : le mycélium d'*Aspergillus niger* et celui d'*Aspergillus Oryzæ*. On sait la prodigieuse activité diastasique des préparations d'*A. niger*, il n'est guère de diastase que l'on ne trouve soit dans la poudre, soit dans le liquide de macération obtenu à partir du mycélium.

La poudre mycélienne d'*A. Oryzæ* est connue sous le nom de takadiastase. Son activité est plus restreinte que celle de l'*A. niger*, mais curieuse par plus d'un côté.

Voici la méthode que nous avons utilisée pour préparer ces produits :

1) *Aspergillus Niger* :

La culture de l'*Aspergillus niger* est des plus faciles. Elle s'effectue pour le mieux sur liquide de Raulin classique, acide. On stérilise 30 minutes à 120°. On peut même se contenter de faire bouillir. Au bout de deux à trois jours de séjour à 37°, si l'on aensemencé le liquide de culture avec des spores provenant d'une souche jeune, le mycélium, parfaitement développé, commence à sporuler. Ce serait, d'après V.-H. YOUNG [14], le moment où le champignon est le plus riche en ferment. On le recueille alors et on le traite pour obtenir soit une poudre fermentaire, soit une liqueur de macération (1).

(1) On peut aussi abandonner le mycélium à l'autolyse dans un peu d'eau sous la protection d'un peu de toluène.

Ces produits constituent une source classique d'inulase et ont été largement utilisés depuis que BOURQUELOT [15] a décrit la préparation de la liqueur de macération à partir d'un mycélium déjà nettement sporulé et qui laisse diffuser dans le liquide sous-jacent une variété considérable de ferments.

De toute façon, on lave soigneusement le mycélium par introduction, après éviction du liquide de culture, d'eau distillée à trois ou quatre reprises. Pour obtenir un liquide fermentaire actif, on remplace alors le liquide de culture par de l'eau légèrement alcalinisée (à l'aide de phosphate disodique) (M. HOLDERER [16]) et on remet à l'étuve pendant 24 heures. On filtre, neutralise (1) et on conserve sous toluène.

On obtient de bons résultats en préparant la poudre fermentaire de la façon suivante : le mycélium, soigneusement séché au papier filtré, est trituré dans un mortier avec de l'alcool à 90-95°. Onessore, triture à nouveau avec un peu d'éther qui déplace l'alcool. On sèche sur vide sulfurique. On obtient ainsi une masse dure et d'aspect corné que l'on pulvérise finement.

L'un et l'autre des produits ainsi obtenus conservent leurs propriétés diastasiques très longtemps. Ces préparations mènent à terme l'hydrolyse de l'inuline en moins de 48 heures.

2) *Aspergillus Oryzæ* :

La culture de cette mucédinée est moins facile que celle de *Aspergillus niger*. Sur Raulin seul, on n'obtient qu'un mécylium grêle en îlots.

(1) Cette précaution est capitale pour la conservation des ferments.

On obtient de bons résultats en ajoutant au liquide de Raulin *neutre*, du riz cuit à l'eau, à raison de 125 gr. de riz pour un litre de Raulin.

On peut également obtenir un mycélium abondant en cultivant sur bouillon de pomme de terre (développement lent) ou mieux sur milieu de Czapek, glucosé (1).

Au bout de quatre à cinq jours, le mycélium ayant atteint son développement maximum, commence à sporuler. On décante le liquide de culture et lave à plusieurs reprises par introduction d'eau sous le mycélium. On opère ensuite comme plus haut pour obtenir soit une poudre mycélienne, soit une liqueur de macération.

(1) Formule de Czapek: on prépare les solutions mères suivantes:

Nitrate de soude.....	200 gr.	par litre
Phosphate bipotassique.....	100 »	—
Chlorure de potassium.....	50 »	—
Sulfate de magnésie.....	50 »	—

Pour préparer un litre de milieu de Czapek, on mélange 10 cm³ de chacune des solutions ci-dessus, on ajoute 20 grammes de glucose et on étend à un litre avec de l'eau distillée.

CHAPITRE II

HYDROLYSE DIASTASIQUE DES FRUCTOSIDES

§ I

L'INULINE

1) *Préparation de l'Inuline*

L'inuline constitue la réserve hydrocarbonée d'un grand nombre de plantes : topinambour, dahlia, chicorée, aunée, artichaut, etc., dans lesquelles elle voisine avec le saccharose, des sucres réducteurs et souvent des fructosides plus ou moins complexes, proches de l'inuline par leur composition que TANRET, H. COLIN et bon nombre d'auteurs nomment « Satellites de l'inuline ».

La préparation de l'inuline est d'autant plus facile que la quantité de « satellites » présents est moindre. Il y a donc intérêt à extraire l'inuline de végétaux chez lesquels, pendant la période de repos, l'inuline reste en proportion sensiblement constante et élevée dans les organes de réserve (H. COLIN [17]).

Nous nous sommes adressés aux tubercules de dahlia, dont une grosse quantité a été mise à notre disposition par les Etablissements Vilmorin, à qui nous exprimons notre gratitude.

Cinq kilos de tubercules soigneusement lavés et séchés à l'air sont débités en cossettes de 1 à 2 mm. d'épaisseur que l'on jette au fur et à mesure dans l'eau bouillante où on les laisse 20 minutes; on filtre alors et on recueille le jus. Après trois épuisements identiques à l'eau bouillante, les cossettes sont pressées et le jus de presse réuni aux liqueurs d'épuisement. On obtient ainsi environ 10 litres de jus.

Défécation. — On ajoute de la chaux éteinte à raison de 5 gr. par litre, à la température de 80° environ. Le floculat se rassemble facilement. On filtre et on procède à une seconde défécation. Nous avons essayé : 1) la chaux en excès avec carbonatation ; 2) la chaux en excès avec précipitation à l'oxalate ; 3) l'acétate basique de plomb.

1° *Traitement à la chaux.* — Calqué sur les opérations industrielles, il consiste à ajouter de la chaux jusqu'à en amener la teneur à 10 gr. par litre. On fait bouillir, on filtre, on fait ensuite passer dans la liqueur *froide* un courant de CO_2 à *refus*! Par ébullition, le bicarbonate de calcium, en solution à la faveur du CO_2 dissous, se transforme en carbonate insoluble. On filtre et on concentre à 1 litre environ.

2° *Traitement à l'oxalate.* — Variante du procédé précédent. L'excès de chaux est précipité, à 70°, par l'oxalate de potassium en léger excès. Après ébullition et dépôt du précipité, on filtre et on concentre.

3° *Traitement au plomb.* — Le jus est déféqué à fond par l'acétate basique de Pb, à froid, puis à chaud. On filtre, on élimine l'excès de Pb par addition de CO_3Na^2 jusqu'à ce que la liqueur ne précipite plus par le chro-

mate de potassium. La filtration du carbonate de plomb est généralement laborieuse, le précipité ayant tendance à passer à travers le filtre. En laissant reposer la liqueur pendant 24 heures, le précipité se dépose et adhère au fond du récipient. Une simple décantation suffit alors et on concentre.

Dépôt de l'inuline : l'inuline, très soluble à chaud, est presque insoluble à froid (1/10.000^e à 15°, d'après TANRET). On tire parti de cette propriété pour recueillir et purifier l'inuline.

Les jus sont abandonnés à la température du laboratoire ou mieux au froid et, après quelques jours, l'inuline commence à se déposer. On remarque que le dépôt est plus dense et se rassemble mieux dans la liqueur traitée au plomb, vraisemblablement parce que la défécation y a été plus complète. Après quelques jours, on décante et on recueille l'inuline dans un peu d'eau. On réunit les trois dépôts et on dissout dans le minimum d'eau chaude. On abandonne à nouveau jusqu'à dépôt et on répète l'opération deux ou trois fois. On obtient de la sorte un dépôt d'inuline parfaitement propre, mais dont la filtration est pénible, à moins que l'on ne mette ce dépôt en suspension dans l'alcool où l'inuline est insoluble. On sèche à l'air. Ce produit, qui contient encore 13 p. 100 d'eau se présente sous forme d'une masse cornée très dure. On concasse grossièrement. On pulvérise au fur et à mesure des besoins.

Nous avons recueilli de la sorte environ 350 grammes d'inuline dont les caractéristiques sont les suivantes :

Humidité	11,64 p. 100
Cendres	0,2 »

Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{18} = 38,30$ (sur le produit sec).

($a = -0^{\circ}57$; $p = 1,24$; $l = 2$; $t = 18^{\circ}$ C.).

Point de fusion au bloc Maquenne: environ 179° .

Les eaux-mères, réunies et concentrées, peuvent donner lieu à un nouveau dépôt d'inuline, bien plus difficile à purifier.

2) *Hydrolyse diastasique de l'inuline :*

L'inuline, depuis bien longtemps, était réputée fermentescible et non attaquable par les préparations de levure, qu'il s'agisse de levures de boulangerie ou de brasserie. Par contre, on savait depuis BOURQUELOT [13] que les préparations fermentaires d'*A. niger* hydrolysaient rapidement l'inuline, et l'on attribuait à un ferment spécial, l'inulase, cette hydrolyse.

Les préparations de levure que l'on employait dans ces recherches étaient soit des extraits aqueux de levure séchée, puis pulvérisée, suivant la technique de BOURQUELOT [18], soit des macérations de courte durée, dans l'eau, de la levure fraîche telle quelle ou broyée avec du sable. C'est, en particulier, la sucrase qu'ont employée MM. WOLFF et GESLIN [19] qui décrivent ainsi sa préparation: « La levure, broyée avec du sable fin, lavé, a été laissée en contact avec de l'eau pendant une demi-heure. Après avoir filtré à la trompe, on a divisé l'extrait en deux parties, dont l'une... etc. »

Or, s'il est exact que de telles préparations sont inactives sur l'inuline, il en va tout autrement des autolysats aseptiques ou septiques, pourvu que la levure soit en assez grande quantité par rapport à l'eau. Nous avons décrit par ailleurs la préparation de ces liqueurs.

Les autolysats en question hydrolysent parfaitement l'inuline, en des temps variables avec les conditions de préparation de la liqueur diastasique et les conditions de l'expérience, et qui vont de 40 jours à plusieurs mois.

Voici, à titre d'exemple, le compte rendu de quelques-unes de nos expériences:

EXPÉRIENCE I

Autolysat: levure de boulangerie, 400 gr.; eau distillée, 1.000 gr. Antiseptique: toluène. Durée de l'autolyse : 2 mois et demi.

Conditions expérimentales : inuline, solution à 2 p. 100, 100 cm³. Autolysat, 10 cm³, pH 4,5. Température : 37°. Antiseptique : toluène.

De temps en temps on prélève 5 cm³ de la liqueur et on dose le réducteur formé, par la méthode de G. BERTRAND. Bien entendu, nous avons fait également deux tubes témoins. A: inuline + autolysat bouilli; B: autolysat + H²O.

Dosage après : Initial	Réducteur formé sur 5 c/m ³ Traces	Réducteur % du réducteur total
5 jours.....	24,1 mgr.	35, p. 100
9 jours.....	30, »	45,5 »
12 jours.....	35, »	53, »
16 jours.....	39, »	59,1 »
21 jours.....	41, »	62,3 »
31 jours.....	49, »	74,25 »
45 jours.....	52, »	78,8 »
68 jours.....	57,8 »	87,8 »
96 jours.....	63, »	95,4 »

Réducteur sur 5 cm³ après inversion (HCl 2 p. 100 au bain-marie bouillant pendant 15 minutes): 66 mgr.

Témoin A: traces de réducteur à la fin de l'expérience.

Témoin B: pas de réducteur à la fin de l'expérience.

EXPÉRIENCE II

Autolysat: levure de boulangerie, 200 grammes; eau distillée, 200 cm³. Antiseptique: toluène. Durée de l'autolyse: 6 mois et demi.

Conditions expérimentales: inuline, environ 2 p. 100, 50 cm³. pH: 4,5. Température: 37°. Autolysat: 5 cm³. Antiseptique: toluène. Dosages comme ci-dessus, mais sur 2 cm³.

Dosage après	Réducteur formé	Réducteur p. 100
Initial	0	»
10 jours.....	20,3 mgr.	60,2
20 jours.....	28,4 »	84,2
52 jours.....	33, »	97,9

Réducteur sur 2 cm³ après inversion: 33,7 mgr.

EXPÉRIENCE III

Avec un autolysat de levure de brasserie, bien moins actif. Conditions expérimentales comme ci-dessus. Dosage sur 5 cm³.

Dosage après	Réducteur formé	Réducteur p. 100
2 jours.....	traces	—
8 jours.....	17 mgr.	38,
16 jours.....	25 »	55,9

Réducteur sur 5 cm³ après inversion: 44,7 mgr.

Ces trois expériences, outre qu'elles illustrent le fait que l'inuline est hydrolysée par les macérations de levure, montrent de plus que la vitesse d'hydrolyse décroît rapidement et devient très lente à la fin de l'expérience.

Nous nous proposons de passer en revue les principaux facteurs influençant l'hydrolyse.

Influence du « pH »

Le pH optimum de l'inulase, ainsi qu'il ressort de différents travaux, et notamment de ceux de BOURQUELOT est de 4,5. Ce pH est également celui qui nous a paru le meilleur. A la neutralité, l'hydrolyse de l'inuline n'a pas lieu ou est très faible. C'est ce qui ressort des chiffres ci-dessous.

Dans les mêmes conditions de concentration et de température, on met à l'étuve deux hydrolyses d'inuline par le même autolysat de levure de boulangerie, l'une à pH 4,5, l'autre à pH 7.

Les résultats sont les suivants, dosages sur 5 cm³:

Dosages après —	Réducteur formé pH : 4,5 —	Réducteur formé pH : 7,0 —
2 jours.....	7,5 mgr.	0
6 jours.....	22,5 »	traces
8 jours.....	30, »	2
15 jours.....	44, »	5

Avec un autre autolysat, dans l'essai à pH 4,5 le réducteur formé, dosé sur 5 cm³ de liqueur est, après 16 jours, de 25 mgr.; dans l'essai à pH 7 on n'en trouve que des traces.

Nous pourrions multiplier les exemples. Ceux-ci suffisent pour vérifier que le *pH* optimum pour l'hydrolyse de l'inuline est situé vers 4,5 et nous ferons en outre observer que l'hydrolyse de l'inuline est nulle ou très faible à un *pH* voisin de la neutralité.

Influence de la température

La température exerce son action dans deux directions, ainsi qu'il a été constaté par nombre d'expérimentateurs :

1° En accroissant la vitesse d'hydrolyse (températures inférieures à la température optimum) ;

2° En détruisant le ferment (au delà de la température optimum).

Nous opérons pour le mieux à la température de 37°. C'est la température qui a été reconnue la meilleure par GREEN et par bon nombre d'auteurs. A la température du laboratoire, la marche de l'hydrolyse est la suivante :

Dosage sur 5 c/m ³	Réducteur	Réducteur p. 100	Témoins
Initial	traces	»	traces
Après 2 mois	32 mgr.	53,3	d°
Après 4 mois et 10 jours..	41 »	68,3	d°
Après 9 mois et 23 jours..	53 »	88,3	d°

Après inversion (HCl 2 p. 100 : 60 mgr.

Ainsi, après plus de 9 mois l'hydrolyse de l'inuline n'est pas encore complète, cependant qu'à 37°, une hydrolyse, avec le même autolysat, dans les mêmes conditions de *pH* et de concentration est menée à terme en moins de 3 mois.

Nous avons fait un essai à 50°. Ici, dès le second jour de l'hydrolyse, on trouve 12 mgr. de réducteur dans les

5 cm³ de prise d'essai. L'hydrolyse ne va pas plus loin: le ferment est détruit, ainsi que nous nous en sommes assurés par l'expérience décrite plus haut (au chapitre de la préparation des produits fermentaires).

Influence des produits d'hydrolyse

On sait que le fructose et le glucose, ajoutés à une solution de saccharose à hydrolyser, ralentissent considérablement l'hydrolyse de ce dernier, le fructose plus que le glucose (H. COLIN et M^{lle} A. CHAUDUN [20]). Fructose et glucose ne sont pas d'ailleurs les seules substances empêchantes: la glycérine, l'aniline, le nitrate d'argent, exercent des actions analogues, qui, dans la plupart des cas, restent inexplicées.

Les actions inhibitrices des produits d'hydrolyse sont dues, d'après EULER et JOSEPHSON [21] à une affinité spécifique du ferment pour les produits de dédoublement.

S'il est vrai, comme il n'est plus possible d'en douter, que le fructose du saccharose, comme celui de l'inuline, est un fructose instable, très différent du fructose commun sur lequel on a expérimenté, l'explication de ces auteurs ne saurait être retenue.

ACHALME [22], le premier, a étudié l'inversion diastatique du saccharose en présence de doses croissantes de glycérol et a montré que le coefficient de viscosité absolue des différentes solutions augmente comme le temps nécessaire à la transformation d'une même proportion de saccharose. H. COLIN et M^{lle} A. CHAUDUN [20] ont constaté également l'influence de la viscosité sur l'hydrolyse du saccharose, qu'elle soit le fait de l'addition de glucose, de fructose ou de glycérine, par

exemple, mais ils ont montré que la variation de la vitesse n'est pas toujours parallèle aux variations de la viscosité.

D'autres phénomènes ont donc du être envisagés : combinaison du produit inhibiteur avec l'enzyme, ou avec son support, modifications des surfaces actives, liées aux modifications des solutions colloïdales que sont les solutions fermentaires.

Nous avons observé l'action du fructose sur l'hydrolyse de l'inuline, et, pour savoir s'il agissait ici comme produit d'hydrolyse, en modifiant l'équilibre inuline-fructose, il nous a paru intéressant de comparer son action à celle du glucose.

Dans une première série d'essais, le fructose est ajouté en quantités croissantes depuis une partie de fructose pour quatre d'inuline, jusqu'à 4 de fructose pour une d'inuline.

Le réducteur est dosé sur 2 cm³, au début de l'opération et en cours d'hydrolyse. On soustrait le réducteur initial du réducteur ainsi dosé : la différence correspond au réducteur formé par hydrolyse de l'inuline.

Les résultats sont les suivants :

	Inuline seule	Inul. 4 p. + Fruct. 1 p.	Inul. 3 p. + Fruct. 2 p.	Inul. 2 p. + Fruct. 3 p.	Inul. 1 p. + Fruct. 4 p.	Fruct seul.
Réducteur initial	traces	3,5 mgr	11 mgr	17,2 mgr	25 mgr	29,9 m
<i>Inuline hydrolysée p. 100</i>						
10 jours..	60,	58,4	55,9	56,2	32,9	
20 jours..	84,2	80,7	75,3	77,5	36,	
52 jours..	97,	92,3	86,4	86,2	39,2	

On perçoit bien, ici, un léger retard à l'hydrolyse dans les trois premiers mélanges. Il est beaucoup plus net dans l'essai qui comporte quatre parties de fructose pour une d'inuline.

Des essais identiques avec le glucose ont donné des résultats peu probants : à peine un léger retard dans les essais où le glucose était en forte proportion.

A titre de vérification, nous avons alors entrepris une série d'hydrolyses dans les conditions suivantes :

A 50 cm³ d'inuline à 3 p. 100, on ajoute 20 cm³ d'une solution de fructose ou de glucose à 10 p. 100 et, après addition de l'autolysat et du toluène, on met à l'étuve à 37°.

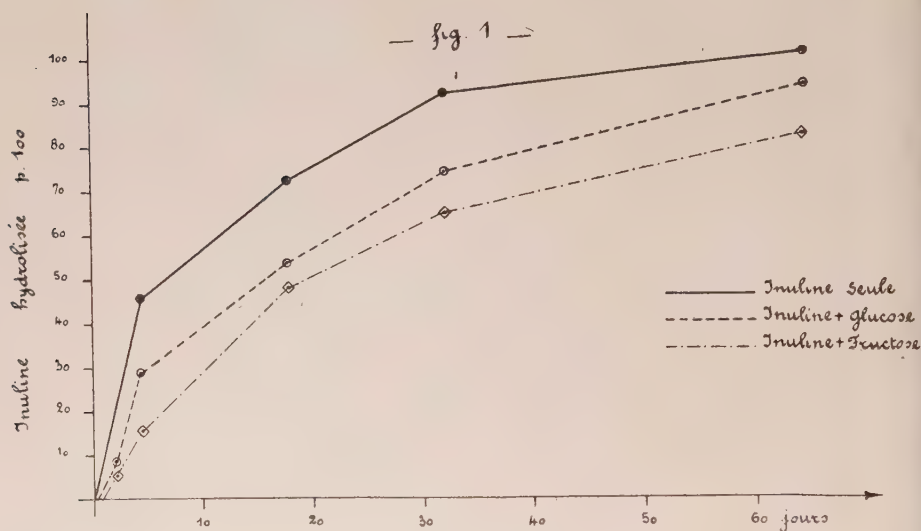
On dose comme précédemment le réducteur formé sur 2 cm³ et, déduction faite du réducteur initial, on calcule le taux de l'inuline hydrolysée, en se basant sur le chiffre obtenu par inversion chlorhydrique.

Inuline hydrolysée p. 100

Dosage après	Inuline seule	Inuline + Glucose	R	Inuline + Fructose	R
—	—	—	—	—	—
2 jours		8,3		traces	
5 jours	45,5	28,6	16,9	15,5	20,
8 jours	47,2	35,2	12,0	20,	27,2
17 jours	71,4	52,7	18,7	47,7	23,7
32 jours	91,6	73,6	18,0	64,4	27,2
64 jours	100,	92,2	8,0	81,6	18,4

Ici, les résultats sont très nets : fructose et glucose retardent l'hydrolyse de l'inuline, le fructose plus que le glucose, dans la proportion de 3 à 2 environ. Il ne s'agit bien que d'un retard, puisque, dans les trois essais précités, l'hydrolyse a pu être menée au terme, bien que

péniblement dans l'essai au fructose. Nous avons indiqué le retard R, différence entre les chiffres de l'hydrolyse normale et de l'hydrolyse retardée : ils sont à peu près constants entre le 5^e et le 32^e jour : voisin de 18 pour le glucose, R atteint 27 pour le fructose. Les courbes que nous donnons ci-dessous sont également significatives.



Pour vérifier que cette action empêchante ne provenait pas d'une action du sucre ajouté sur le ferment, nous avons traité un autolysat — le même qui nous avait servi dans les expériences mentionnées ci-dessus — par une quantité importante des deux hexoses en question : 10 cm³ d'une solution à 10 p. 100 pour 20 cm³ d'autolysat, et abandonné le tout pendant 37 jours.

Nous faisons alors agir ces autolysats sur une solution d'inuline à 3 p. 100. En même temps, un essai avec le

même autolysat non traité, mais dilué de la même façon que les autolysats traités, est mis à l'étuve.

Les dosages, effectués sur 5 cm³, nous donnent, le réducteur initial étant déduit, naturellement :

Après	témoin	Autol. traité au glucose	Autol. traité au fructose
5 jours	26,3 mgr.	27,5 mgr.	27,6 mgr.
16 jours	57,5 »	58,5 »	61,7 »

Comme nous nous y attendions, on ne constate aucun retard à l'hydrolyse, du fait du traitement des autolysats par les produits d'inversion du saccharose.

Ce que l'on sait jusqu'à présent de l'hydrolyse du saccharose par la sucrase ne permet pas d'admettre sans discernement l'hypothèse de la formation d'un complexe enzyme-sucre inhibiteur (H. COLIN et M^{me} A. CHAUDUN). D'autre part, le fructose retarde bien d'autres hydrolyses, notamment celle du maltose qui, pourtant, n'est formé que de glucose, de même que les aldéhydes, les alcools, l'acétone retardent nettement l'hydrolyse du saccharose par la sucrase. L'action du formol, notamment, a été étudiée récemment de très près (MASCRÉ et PARIS [23], M^{me} A. CHAUDUN [24]).

Notre ignorance à peu près complète de la nature de la micelle diastasique nous interdit pour le moment de formuler d'autres hypothèses. La viscosité, qui exerce certainement une influence, n'est pas le seul facteur en jeu, puisqu'elle ne permet pas de résoudre entièrement le problème et, en particulier, d'expliquer pourquoi, à doses égales, le fructose retarde plus l'hydrolyse que ne le peut faire le glucose.

Le fait n'en est pas moins intéressant à noter et per-

met peut-être d'expliquer pourquoi l'hydrolyse de l'inuline, rapide au début, voit sa vitesse diminuer progressivement jusqu'à devenir, dans les cas où la diastase n'est pas très active, très petite et même presque nulle.

Action des sels en faible proportion

Nous avons essayé l'action des sels suivants : chlorure de sodium, phosphate trisodique, phosphate monosodique, citrate de soude, et, en outre, l'action du liquide fermentaire (macération) d'*A. niger* bouilli, pour le cas où ce produit renfermerait un coferment thermostable capable d'activer l'action de l'inulase de la levure.

Tous ces produits ont été employés à la dose de 0 gr. 02 p. 100.

Voici les résultats des dosages exprimés en réducteur p. 100 du réducteur formé après inversion acide :

	Sans sels	NaCl	PO ₄ Na ³	PO ₄ NaH ²	Citrate	Liquide fermentaire d' <i>Asp. niger</i> bouilli
5 jours...	35,	34,8	34,8	33,4	33,6	34,8
16 jours...	59,	52,28	51,5	52,8	53,	58,5
21 jours...	62,3	57,8	54,5	56,5	57,8	59,5
45 jours...	78,8	74,54	66,6	78,2	74,5	73,4

Ces différences, on le voit, sont minimales et aucune action ne s'est manifestée ni dans le sens d'un accroissement de la vitesse d'hydrolyse, ni dans le sens opposé. Les seules modifications qui puissent être provoquées par ces sels sont dues aux modifications du milieu et en particulier aux variations du pH, d'ailleurs très faibles, et ne dépassant pas 0,5 unités de pH. Il peut sembler

étonnant, *a priori*, que le phosphate trisodique ne retarde pas plus qu'il ne le fait l'hydrolyse de l'inuline, en raison de l'alcalinité qu'il confère à ses solutions. Mais la dose employée était très faible et, d'autre part, l'autolysat est un milieu complexe et « tamponné ».

Influence des concentrations de l'inuline et du ferment

Lorsqu'on hydrolyse le saccharose par de petites doses d'invertine, on constate que la quantité de sucre hydrolysé pendant un temps donné croît avec la quantité d'enzyme jusqu'à un point où toute addition de liqueur fermentaire est superflue. Passé ce point, le ferment est toujours en excès par rapport au sucre.

Inversement, aux très faibles concentrations, la vitesse d'inversion est proportionnelle à la quantité de sucre en solution.

Nous avons recherché ce maximum utile de ferment pour l'hydrolyse de l'inuline et ce, par deux moyens différents :

1°) laissant fixe la teneur en inuline, nous faisons croître la quantité de ferment;

2°) laissant fixe la quantité de ferment, nous faisons croître la quantité d'inuline.

Si le maximum en question existe, on devrait trouver par l'une et l'autre technique le même rapport : sucre-liqueur fermentaire, à condition d'employer les mêmes produits.

Voici comment nous avons conduit ces expériences :

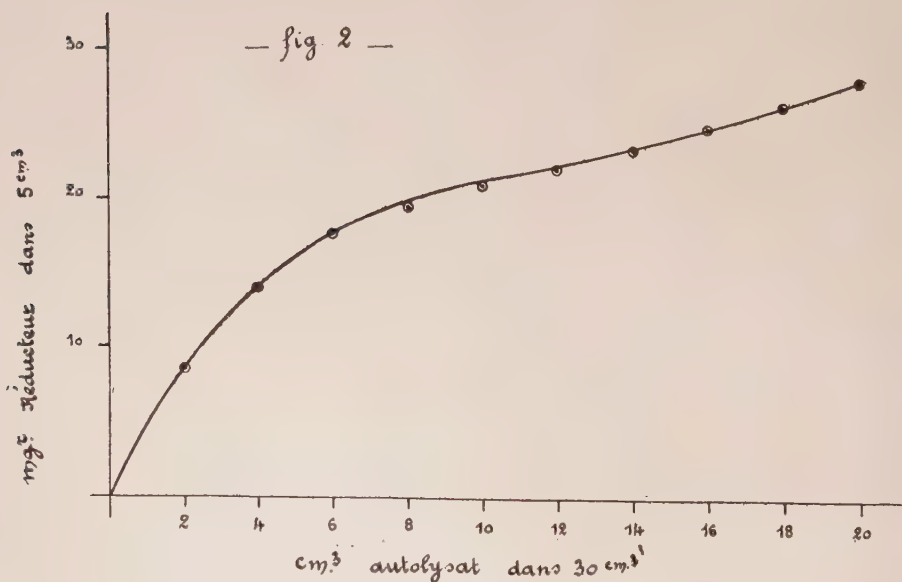
1) Quantité fixe : inuline :

A 10 cm³ d'une solution d'inuline à 9 p. 100, on ajoute des quantités d'autolysat croissantes de 2 à 20 cm³ par

2 cm³ (1). On amène le volume à 30 cm³ dans tous les cas; la concentration de l'inuline se trouve donc être, dans chaque essai, égale à 3 p. 100. Les tubes sont placés à l'étuve à 35° et le réducteur est dosé après 48 heures sur 5 cm³ de la solution; les résultats sont les suivants:

c/m ³ autolysat dans 30 c/m ³	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
mgr. Réducteur dans 5 c/m ³	8,5	14	17,5	19	20,5	21,7	22,8	24,5	25,8	27,3

Nous ne voyons donc pas apparaître nettement le maximum. La courbe (fig. 2) accuse seulement un changement de direction pour 6 cm³ d'autolysat environ. A partir de 6 cm³, la courbe se ramène sensiblement à une droite.

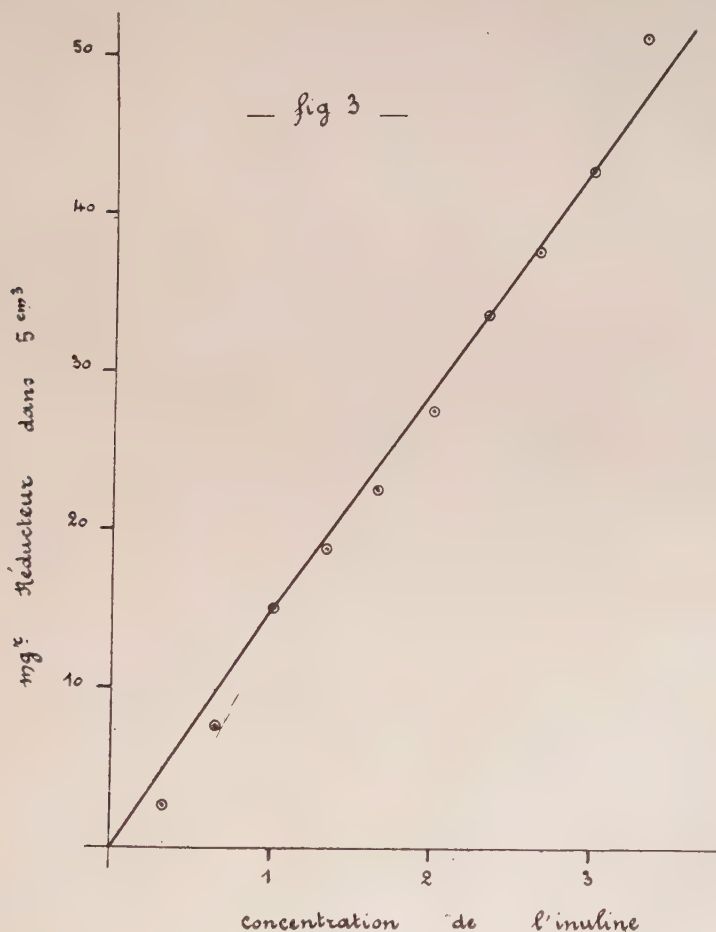


(1) L'expérience nous ayant montré que des doses de liqueur fermentaire inférieures à 10 p. 100 en volume pour une solution d'inuline à 2 p. 100 ne provoquent que des hydrolyses très lentes.

2) *Quantité fixe : ferment :*

A 5 cm³ du même autolysat que précédemment, nous ajoutons par quantités croissant de 2 cm³, 2 à 20 cm³ d'une solution d'inuline à 5 p. 100 et amenons le volume à 30 cm³. Les tubes sont placés à l'étuve à 35°.

Après 48 heures, on dose le réducteur formé sur 5 cm³ de liqueur.



Les résultats sont les suivants :

cm ³ sol. inuline dans 30 cm ³	2		4		6		8		10		12		14		16		18		20
concentration.	0,33		0,66		1,0		1,33		1,66		2		2,33		2,60		3		3,33
mgr. réducteur dans 5 cm ³	2,5		7,5		15		18,7		22,5		27,5		33,7		37,5		42,7		51,2

Ici, il n'apparaît pas dans la courbe de changement de direction (fig. 3). La quantité de réducteur formé croît constamment avec la quantité d'inuline mise en œuvre. On ne peut augmenter la concentration de l'inuline bien au delà de 3 à 4 p. 100, son peu de solubilité s'y opposant. Elle ne tarderait pas à se déposer.

Ainsi, la courbe d'hydrolyse de l'inuline n'est pas exactement comparable à celle du saccharose : la complexité de la molécule doit être en cause. La réaction a tout à fait l'allure de l'hydrolyse de l'amidon.

ACTION DE QUELQUES AUTRES MILIEUX FERMENTAIRES

L'autolysat de levure de boulangerie se révèle donc comme une source commode d'inulase. Malheureusement, son action est lente et difficilement complète. En est-il de même des autres sources d'invertine ? Nous avons examiné les plus classiques.

En tête de ces préparations se placent la poudre mycélienne et les liqueurs de macération obtenues à partir de l'*A. niger*. L'une et l'autre hydrolysent l'inuline très rapidement : en moins de 48 heures, tout le fructoside est passé à l'état de sucre réducteur. A quoi attribuer cette activité ? A une concentration plus grande en inulase ? Peut-être, mais nous avons vu combien lentement croît la vitesse d'hydrolyse lorsqu'on ajoute du ferment. Le milieu contient-il un complément minéral, activant fortement la réaction ?

Rien ne sert d'ajouter à l'autoylsat de levure le liquide d'*Aspergillus* bouilli, non plus que la poudre mycélienne ainsi traitée. Faut-il invoquer l'association heureuse de deux ferments ? On sait la richesse du milieu en hydrolases de toutes sortes, mais la nécessité de deux ferments distincts est loin d'être prouvée.

Nous avons essayé de séparer, dans la poudre fermentaire d'*A. niger*, la saccharase et l'inulase par chauffage à 50°, suivant la méthode que nous avons exposée plus haut. La résistance à la chaleur des poudres fermentaires est, comme on le sait, beaucoup plus grande que celle des liqueurs diastasiques, mais cependant, les résultats sont suffisamment nets pour permettre de conclure qu'une partie de l'inulase a été détruite, tandis que la saccharase restait inaltérée.

Plusieurs portions de 1 gr. de poudre mycélienne d'*A. niger* sont chauffées, dans 50 cm³ d'eau, à 50° pendant 15, 21 et 43 heures. Après agitation, on prélève 5 cm³ de la suspension aqueuse, qui servent à l'hydrolyse d'une solution d'inuline à 2 p. 100, à l'étuve à 37°. Les dosages de réducteur, effectués sur 2 cm³ après 24 heures de séjour à l'étuve, donnent :

	non	chauffé	chauffé	chauffé
<i>A. niger</i>	chauffé	15 h.	21 h.	43 h.
Réducteur	88 mgr.	63 mgr.	61 mgr.	38 mgr.

Nous avons pu constater que l'activité des préparations (chauffées et non chauffées) sur le saccharose était identique.

Les préparations d'*A. Oryzæ*, par contre, se conduisent tout différemment : parfaitement actives sur le saccharose, la poudre mycélienne (takadiastase) et la liqueur

de macération n'hydrolysent jamais l'inuline. Nos essais ont duré parfois plus de trois mois, aux pH les plus divers : jamais nous n'avons observé l'apparition de réducteur.

Le Mucor Boulard, que nous avons essayé, est un mucor de distillerie. Nous l'avons utilisé sous la forme de poudre mycélienne assez grossière. Comme l'*A. Oryzæ*, il s'est montré incapable d'hydrolyser l'inuline.

Les autolysats de levure de brasserie que nous employons méritent d'être mentionnés ici. Leur action sur l'inuline est bien différente de celle des préparations de levures de boulangerie : l'hydrolyse est au début assez rapide, mais la vitesse diminue quand 40 à 50 p. 100 du produit sont transformés. L'hydrolyse se poursuit encore péniblement jusque 65-70 p. 100. Il est rare qu'elle aille au delà et nous n'avons jamais obtenu d'hydrolyses totales avec de telles préparations. Et ces faits imposent une remarque du plus haut intérêt : on a coutume de parler de l'autolysat de levure comme d'un produit bien défini auquel on attribue généralement l'appellation d'« invertine » ; on a cependant, depuis très longtemps, fait la distinction entre levures hautes et levures basses. Faut-il rappeler ici que les levures hautes seules hydrolysent le mélibiose et le turanose, et que BOURQUELOT eut toujours soin de spécifier que c'est aux levures de brasserie qu'il faut s'adresser pour la préparation de la glucosidase α ?

Et que dire des actions diastasiques si diverses et si différentes dont la description accompagne généralement l'étude morphologique et physiologique d'une espèce de levure ? On connaît des levures qui n'hydro-

lysent pas le saccharose. Les faits que nous avons relatés apportent une raison de plus non seulement de distinguer entre levure haute et levure basse (les levures de brasserie sont généralement désignées sous le nom de levures basses, bien que certaines de ces levures soient de véritables levures hautes; les levures de boulangerie sont généralement des levures hautes), mais encore entre les différentes espèces, ou à défaut entre les différents produits industriels. Nous avons noté plus loin que, reproduisant des expériences de C. NEYRON, nous n'avons pu retrouver ses résultats; la raison était que C. NEYRON employait une levure viennoise qu'il trouvait à Beyrouth, et dont les propriétés différaient sans doute notablement de celles de la levure que nous employons.

HYDROLYSES INCOMPLÈTES

Lorsqu'on opère l'hydrolyse de l'inuline par des préparations de faible pouvoir hydrolysant — macérations de courte durée de levure dans l'eau (1 mois à 1 mois 1/2) avec ou sans putréfaction — on observe une allure très particulière de la marche de l'hydrolyse : la vitesse de réaction, d'abord relativement grande, diminue assez rapidement pour devenir presque nulle. La réaction semble arrêtée, bien que le terme de l'hydrolyse ne soit pas atteint. Si l'on ajoute à la liqueur une nouvelle quantité d'autolysat, la réaction se ranime avec une vitesse appréciable, pour s'arrêter de nouveau, parfois avant que l'inuline ne soit totalement hydrolysée. Et si l'on ajoute de l'inuline fraîche à une hydrolyse ainsi arrêtée, la réaction se ranime également, bien que le plus souvent la vitesse soit petite.

Le cas de l'inuline n'est pas un cas isolé. Les quelques auteurs qui ont observé l'hydrolyse des fructosides par les préparations de levure ont fait la même observation. C'est le cas, en particulier, pour l'asphodéloside (C. NEYRON [7]) et pour le lycoroside B (H. BELVAL [8]). Ces deux auteurs emploient une sucrase préparée par putréfaction ménagée de la levure en milieu aqueux. Nous montrerons que la marche de l'hydrolyse est bien différente lorsqu'on emploie les autolysats aseptiques : l'hydrolyse de l'asphodéloside et du lycoroside est alors menée à terme très rapidement.

Les expériences suivantes illustrent les faits que nous signalons ci-dessus :

A) — 100 cm³ d'une solution d'inuline à 2 p. 100 sont additionnés de 10 cm³ d'un autolysat faible. Après 35 jours, la vitesse d'hydrolyse est pratiquement nulle et le taux de l'inuline hydrolysée atteint 40 p. 100. On fait alors trois parts de la liqueur. La première servira de témoin, la deuxième est additionnée du dixième de son volume du même autolysat, et on ajoute à la troisième un égal volume d'une solution fraîche d'inuline à 2 p. 100.

Ces trois essais sont placés à l'étuve à 35-37° et le réducteur est dosé de temps à autre sur chacune des liqueurs. Nous avons exprimé, comme d'habitude, le rapport du réducteur formé au réducteur total obtenu par hydrolyse acide.

Réducteur formé après		Témoin		Sol primitive + autolysat		Sol. primitive + inuline	
Initial		40,	p. 100	36,	p. 100	20,	p. 100
3 jours		40,5	»	41,1	»	21,	»
9 jours		41,2	»	45,9	»	26,	»
21 jours		43	»	65,0	»	36,5	»

L'hydrolyse a donc bien progressé à nouveau, que l'on ait ajouté de l'autolysat ou que l'on ait ajouté de l'inuline, tandis que le témoin (hydrolyse normale) progressait à peine. Nous nous étions assurés, naturellement, que le pH n'avait pas varié et restait situé aux environs de 4,5.

Les résultats de C. NEYRON et H. BELVAL se rapprochent de l'expérience citée plus haut.

B) — Action de la sucrase sur l'asphodéloside (C. NEYRON):

Jours —	Déviatiôn —	
0.....	— 3°34'	
18.....	— 2°14'	la déviation reste stationnaire

On ajoute de la sucrase :

29.....	— 4°25'	la déviation reste stationnaire
---------	---------	---------------------------------

Une nouvelle addition de sucrase reste sans effet. Après inversion acide, la déviation est $\alpha = -7^\circ$.

C) — Action de la sucrase sur le lycoroside B (H. BELVAL):

Dates —	Rotation —	Réducteur p. 100 (1) —
14 février	— 1°48'	0,064 p. 100
18 »	— 2°30'	
24 » (terminé) ...	— 2°50'	0,570 p. 100

Addition de 0 cm³ 5 de sucrase (pour 50 cm³):

6 mars (terminé)...	1,40 p. 100
---------------------	-------------

(1) Pour 100 cm³ de solution.

Addition de 1 cm³ de sucrase :

Hydrolyse par HCl..	— 6°20'	4,60 p. 100
14 mars (terminé)...	— 3°20'	1,65 p. 100

*
**

La similitude de ces trois hydrolyses est frappante. De plus, les observations des auteurs et les nôtres s'accordent sur ce point que la quantité de glucide non transformé est variable suivant les conditions de l'expérience et la nature de la liqueur diastasique mise en œuvre.

Cela laisse à penser que la préparation fermentaire ne contient qu'une petite quantité de l'enzyme nécessaire pour hydrolyser le fructoside. On s'expliquerait l'arrêt de la réaction par une fatigue ou un « empoisonnement » du ferment, comme cela a lieu pour les catalyseurs minéraux. Le fait que l'hydrolyse repart par addition d'autolysat confirme cette façon de voir. D'autre part, l'on sait que les produits riches en inulase (*A. niger* par exemple) mènent rapidement à terme l'hydrolyse de l'inuline.

Mais alors, comment expliquer qu'une solution d'inuline fraîche soit encore attaquée par le ferment qui a déjà servi ?

Si l'arrêt de l'hydrolyse ne peut être imputé à la seule liqueur fermentaire, on mettra en cause la constitution de l'inuline.

*
**

De nombreux auteurs s'efforcent de pénétrer ce problème, mais ce que l'on connaît sur ce point est encore

trop controversé pour pouvoir servir de base à une explication. Les hypothèses, comme les résultats, sont très différentes.

Le premier point sur lequel l'accord reste à faire est le poids moléculaire de l'inuline. Les méthodes les plus variées ont cependant été employées : cryoscopie dans l'eau, l'ammoniac liquide et les solvants les plus variés, ébullioscopie. Les résultats sont au moins aussi divers que les méthodes employées.

Dans l'ammoniac liquide, le poids moléculaire trouvé conduit à une molécule d'inuline formée de deux restes d'hexose : les chiffres donnés gravitent en effet autour de 320. SCHMID et BECKER [25] donnent 315-375, REILHEN et NESTLE [26] 320 ± 40 ou 337 ± 40 ; PRINGSHEIM, REILLY et DONOVAN [27] attribuent à l'inuline la formule $(C^6H^{10}O^5)^2$; puis, en 1931, SCHMID et HASCHEK [28] donnent 275-333. Ces résultats ont été donnés également par SCHMID et FALKE [29], SCHMID et ZACHERL [30]. Par cryoscopie dans l'eau, TANRET [2] avait trouvé 4950, la méthode n'a pas été reprise, mais, par ébullioscopie dans l'eau, DREW et HAWORTH [31] trouvent au début des résultats concordant avec ceux de TANRET, mais signalent que le poids moléculaire décroît avec la durée de l'ébullition pour finalement descendre vers 900.

Les hypothèses sur la structure de l'inuline que nous exposerons plus loin, tendent presque toutes à donner à l'inuline un poids moléculaire compris entre 5 et 6.000; JACKSON et MAC DONALD [32] émettent même l'hypothèse d'un poids moléculaire de 18.000.

Il est vraisemblable en effet, que les résultats qui donnent comme poids moléculaire de l'inuline environ 320, s'adressent à l'élément fondamental de la molé-

cule, qui se condense pour donner l'inuline, comme le maltose pour donner l'amidon.

Il est donc probable que le poids moléculaire de l'inuline soit situé, comme l'avait dit TANRET, aux environs de 5.000, et que, partant, il faille envisager une vingtaine de restes d'hexoses.

Ces hexoses sont-ils uniquement du fructose, ou existe-t-il dans la molécule d'inuline une petite quantité de glucose ? TANRET, le premier, avait annoncé la présence de glucose pour environ 1/12^e de la molécule d'inuline. Puis BOURQUELOT et BRIDEL [33] par la méthode biochimique à l'émulsine, avaient conclu à sa non-existence. De plus récents travaux, notamment ceux de SCHLUBACH et KNOOP [34], JACKSON et MAC DONALD [32], PRINGSHEIM et OLHMEYER [35], tendent à donner raison aux conclusions de TANRET, la quantité de glucose n'excédant cependant pas 3,7 p. 100.

Il n'en reste pas moins que la plus grande partie de la molécule d'inuline est composée de fructose. Mais comment ces fructoses sont-ils liés et s'agit-il d'un seul isomère de cet hexose ?

Il est à peu près établi maintenant que par hydrolyse ménagée, soit par CO², par chauffage avec la glycérine ou le benzamide, ou mieux encore par hydrolyse ménagée au moyen des acides, on obtient au moins un anhydride de difructose dans lequel quelques auteurs veulent voir le noyau de base de l'inuline. On aurait même préparé des produits intermédiaires entre l'inuline et le fructose, notamment VOGEL et PICTET [36] qui traitent l'inuline par la glycérine à chaud et sous pression et obtiennent une série de corps intermédiaires : trifructosane, difructosane, monofructosane. BERNER [37] con-

teste l'existence de ces corps et montre qu'il s'agit seulement d'un mélange de glycérine et d'inuline en proportions variables. Il conteste de même les travaux de PRINGSHEIM, REILLY et DONOVAN [27] qui protestent [38] que l'inuline employée était exempte de substances étrangères. BERNER [39] invoque alors la transformation subie par l'inuline en présence de l'alcool. Par ailleurs, SCHLUBACH et FLORSHEIM [40], et SCHLUBACH et ELSSNER [41] ont décrit un corps qu'ils nomment Sinistrine A et qui serait un produit de dégradation de l'inuline, qu'ils ont extrait de *Scilla maritima*. La plupart des autres auteurs commencent par méthyler ou acétyler l'inuline, puis par hydrolyse ménagée au moyen des acides étendus, libèrent des composés qu'ils nomment difructose-anhydride ou dilévane. Mais les propriétés de cet anhydro-fructose variant d'un auteur à l'autre, on se trouve en présence de plusieurs anhydrides de difructose. C'est JACKSON et GÆRGEN [42] qui, les premiers, décrivent dans le résidu d'hydrolyse de l'inuline par les acides dilués un produit, obtenu par acétylation, de pouvoir rotatoire $= -0,54$, qui désacétylé donne un anhydride de difructose $[\alpha]_D = -27$, livrant uniquement du fructose à l'hydrolyse.

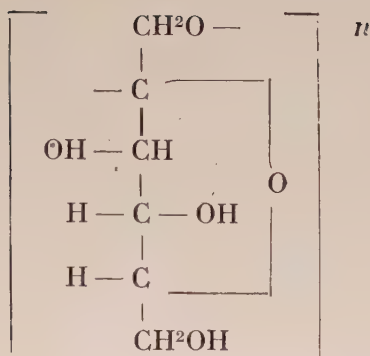
De leur côté, IRVINE et STEVENSON [43] hydrolysant par l'acide nitrique la triacétylinuline dans le chloroforme, décrivent un composé résistant à l'hydrolyse, constituant 20 p. 100 environ de la triacétylinuline, que les auteurs décrivent comme le triacétylanhydro-fructose, qui donne, par désacétylation, un anhydrofructose $[\alpha]_D = -30,7$, beaucoup plus résistant à l'hydrolyse, disent

les auteurs, que les dérivés du γ fructose. Ils admettent donc dans l'inuline la présence d'au moins deux formes de fructose.

JACKSON et GERGEN [42] confirment d'ailleurs que les deux anhydrides sont différents et JACKSON et MAC DONALD [41] isolent les anhydro-fructoses en hydrolysant l'inuline de différentes sources, très purifiée. Le fait, disent les auteurs, que le difructose anhydride ne se trouve pas dans l'hydrolyse des produits voisins de l'inuline, prouve que ce difructose anhydride est à la base de la molécule d'inuline.

C'est aussi l'avis de SCHLUBACH et ELSNER [45] qui l'ont préparé par synthèse (condensation de fructose en présence d'acétone). Les mêmes auteurs isolent également, dans les produits de dégradation de l'inuline, deux anhydrides de difructose [41]. Un peu plus tard, JACKSON et MAC DONALD isolent non plus deux, mais trois anhydrides de difructose. Le pouvoir rotatoire du mélange, comparé à celui de chacun de ces corps, montre que les trois composés existent sans doute en proportions égales : ceci conduit les auteurs à accorder à l'inuline un poids moléculaire voisin de 18.000.

Pour HAWORTH et ses collaborateurs, ces difructose-anhydrides ne préexistent pas dans la molécule de l'inuline, mais sont des produits de regroupement des restes de fructose libérés par hydrolyse. Les fructoses seraient liés l'un à l'autre dans les positions 1 et 2 : la formule de l'inuline serait alors [46]):



Ils font d'ailleurs remarquer que tous les essais pour déterminer le nombre d'anhydro-fructoses dont serait formée la molécule d'inuline ont donné des résultats discordants. Ils admettent comme la plus vraisemblable une structure en chaîne ouverte, ceci concordant d'ailleurs avec le léger pouvoir réducteur manifesté par tous les échantillons d'inuline.

Que conclure de tout ceci ? Que l'existence dans l'inuline de deux liaisons différentes peut être envisagée, qu'il s'agisse de liaisons entre deux ou plusieurs isomères du fructose, ou de la préexistence dans l'inuline du ou des difructoses anhydrides, contrairement aux idées de HAWORTH,

Dans ces conditions, nous pourrions peut-être donner une explication aux phénomènes que nous avons signalés plus haut, explication que nous ne pourrions fournir autrement.

Supposons que l'inuline renferme deux liaisons différentes A et B, les diastases nécessaires pour rompre ces liaisons étant *a* et *b*, et admettons que, dans l'autolysat de levure, *b* soit beaucoup moins abondant que *a*. Nos

expériences s'interpréteraient alors de la façon suivante :

1^{er} temps : les liaisons A sont totalement hydrolysées par la diastase *a*, une partie des liaisons B est de même hydrolysée par *b*, mais cette dernière diastase était en très faible proportion, l'hydrolyse s'arrête.

2^e temps : on ajoute de la liqueur fermentaire : une partie de B s'hydrolyse à nouveau sous l'influence de *b*.

3^e temps : on ajoute de l'inuline fraîche, les liaisons A sont naturellement hydrolysées par la diastase *a* qui, elle, est abondante.

Ceci n'est, bien entendu, qu'une hypothèse à peu près purement gratuite. Mais elle explique l'arrêt et les reprises des hydrolyses d'inuline. Les objections que l'on pourra faire à cette manière de voir sont nombreuses, nous en avons nous-mêmes envisagé un certain nombre.

La principale est celle-ci : si notre hypothèse est exacte, on devrait trouver dans les liqueurs hydrolysées, au moment où l'hydrolyse s'arrête, autre chose que du fructose et de l'inuline. Or, nous n'y avons jamais trouvé rien d'autre. Il est vrai que nous introduisons avec l'autolysat un certain nombre d'impuretés qui compliquent singulièrement la tâche. La seule vraie solution serait l'étude de l'hydrolyse fermentaire, sous l'action de l'autolysat de levure, des produits de l'hydrolyse incomplète de l'inuline préparée par les procédés qui ont été décrits par les auteurs cités plus haut. Nous avons estimé que ce travail s'écarterait par trop du but que nous nous étions fixé — l'étude comparée de l'hydrolyse diastasique des fructosanes — et que cette question pourrait être reprise ultérieurement avec fruit, ce que nous nous proposons de faire.

HYDROLYSE DES FRUCTO-POLYOSIDES

Un certain nombre d'espèces végétales renferment au lieu d'inuline, ou même quelquefois à côté de l'inuline, des glucides qui, hydrolysés par les acides dilués, livrent soit du fructose seul, soit un mélange de fructose et de glucose, ce dernier en faible proportion. Leur identité est parfois douteuse, leur isolement étant souvent fort délicat.

Nous avons examiné, du point de vue de l'action des diastases de l'autolysat de levure, un certain nombre de ces glucides parmi les mieux caractérisés, en les divisant en deux groupes :

- 1° Glucides ne livrant à l'hydrolyse que du fructose ;
- 2° Glucides livrant à l'hydrolyse un mélange de fructose et de glucose.

Dans le premier groupe : Irisoside (Irisine), Triticoside, Graminoside.

Dans le second groupe : pseudo-Inuline, Lycoroside, A et B, Asphodéloside, Synanthrine et un fructoside retiré de l'*Hemerocallis*.

Ce qu'on sait de l'hydrolyse diastasique de ces corps peut se résumer ainsi : la plupart de ces corps, si facilement hydrolysés par les acides, se montrent rebelles à l'action des diastases des levures. Cependant, chacun des auteurs ayant décrit les corps sus-mentionnés, a étudié l'action des diastases et en particulier de la sucrase. Pour quelques-uns de ces corps, la sucrase est inactive; pour d'autres, son action est incomplète. Il n'y a guère que la graminine (COLIN et DE CUGNAC [47] qui soit facilement hydrolysée par les préparations de levure.

Mais la plupart de ces auteurs emploient pour leurs expériences, soit la sucrase préparée par putréfaction ménagée de la levure, soit le macéré de poudre de levure suivant BOURQUELOT. Qu'en est-il lorsqu'on a recours aux autolysats tels que nous les préparons ?

**

1^{er} groupe. — Glucides ne fournissant à l'hydrolyse que du fructose.

IRISINE (*Irisoside*)

L'irisoside, découvert par WALLACH, existe en abondance dans les rhizomes de l'*Iris pseudacorus*, dont il constitue la quasi-totalité de la réserve glucidique. Il a fait récemment l'objet d'une étude très complète par AUGEM.

On l'extrait par épuisement de la pulpe à l'eau froide, défécation et précipitation à l'alcool. On le purifie de la même façon par dissolution dans l'eau et précipitation à l'alcool.

L'irisine fond vers 208° (WALLACH) ou 160° (ERKSTRAND et MAUZÉLIUS) en se décomposant (1). Son pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D = -51$, il peut aller jusqu'à -54 et -56 suivant la concentration des solutions (KELLER). Elle est peu soluble dans l'eau froide, plus soluble à chaud.

Par hydrolyse acide, l'irisine ne donne que du fructose.

(1) Les points de fusion des fructosides manquent souvent de netteté. Le produit se ramollit, puis brunit et charbonne sans présenter, souvent, de point de fusion véritable.

L'irisine dont nous nous sommes servi avait été extraite par AUGEM des rhizomes d'*Iris Pseudacorus*.

AUGEM, comme ses prédécesseurs, affirme que l'irisine est « absolument rebelle à l'action de la sucrase ». Ce n'est pas tout à fait exact : l'irisine est hydrolysée par les autolysats de levure, mais lentement et très incomplètement ; seuls produisent une hydrolyse appréciable les autolysats très concentrés.

Nous avons procédé à de multiples expériences. Nous en extrayons les exemples suivants :

I. — Irisine, environ 2 p. 100 : 50 cm³ + autolysat (levure de boulangerie 1 p., eau 3 p.) 5 cm³ — dosages sur 5 cm³ :

Jours	Réducteur mgr	Réducteur p. 100
9 jours	4	4
20 jours	10	9
45 jours	16	12
76 jours	26	21,3
Hydrolyse acide	115	

II. — Irisine, environ 2 p. 100 : 50 cm³ + autolysat 1 p., eau 1 p.) 5 cm³ — dosage sur 5 cm³ :

Jours	Réducteur mgr	Réducteur p 100
6 jours	6,8	7,
12 jours	11,5	13,1
15 jours	16,2	18,5
50 jours	32,7	37,5
73 jours	39,	44,5
89 jours	46,2	52,8
118 jours	56,5	64,5

L'hydrolyse de l'irisine montrant une telle lenteur, il nous a paru intéressant de reprendre sur ce corps les expériences sur les hydrolyses incomplètes que nous avons faites sur l'inuline. Malheureusement, la lenteur même de l'hydrolyse de l'irisine est un gros obstacle à leur réalisation. Il est infiniment probable que l'hydrolyse se poursuit très longtemps avec une vitesse infime et, dans ces conditions, il est difficile d'observer le moment où la réaction s'arrête. Voici d'ailleurs les résultats de nos essais :

A 100 cm³ d'une solution d'irisine à 2 p. 100, nous ajoutons 10 cm³ d'un autolysat très actif (Cf. expérience 2). Après 50 jours, l'hydrolyse ne progressant presque plus, nous prélevons deux fois 20 cm³ de solution. Nous ajoutons à la première fraction 2 cm³ d'autolysat frais et à la seconde 10 cm³ d'une solution fraîche d'irisine à 2 p. 100.

L'hydrolyse a partout progressé (dans l'essai initial également). Nous donnons ci-dessous les pourcentages de réducteur observés. Les temps sont comptés à partir du début de l'expérience :

Jours	Sol. initiale	Sol. initiale + autolysat	Sol. initiale + irisine
50 jours	37,3	37,3	24,8
54 jours	»	41,4	»
57 jours	»	46,3	»
73 jours	44,5	55,1	29,6
89 jours	»	»	34,8
117 jours	64,5	75,4	43,2

Le réducteur n'a notablement augmenté que dans l'essai où nous avons ajouté de l'autolysat. Dans le tube où nous avons ajouté de l'irisine, tout se passe comme

si, l'irisine n'ayant pas été touchée, nous avons dilué le milieu de 1/3. En multipliant les chiffres obtenus par $\frac{3}{2}$, on retrouve à peu près les résultats de l'essai initial. Ceci ne nous apporte rien au sujet de l'hydrolyse partielle de l'inuline. On n'observe même pas le même phénomène, puisque seul l'essai où nous avons ajouté du ferment montre un excès de réducteur par rapport à l'essai normal.

La poudre mycélienne d'*A. Niger*, elle-même, attaque péniblement l'irisine. Voici la marche d'une expérience :

Irisine 2 p. 100 environ..... 50 cm³
 Poudre d'*A. niger* 0 gr. 5 pH = 4,5
 Dosages sur 5 cm³.

Temps	Réducteur dosé	Réducteur p. 100
3 jours	14,	13,6
6 jours	20,2	19,7
12 jours	27,7	26,5
50 jours	55,5	54,1
73 jours	82,5	80,4

Les autolysats de levure de brasserie, ainsi que les préparations d'*A. Oryzæ*, sont sans action.

TRITICINE

La triticine a été découverte par MULLER dans les rhizomes de *Triticum repens* L. (*Agropyrum repens*, P. BERNER) qui constituent le chiendent pharmaceutique. On l'extrait par l'eau, puis, après défécation, on la précipite à l'état de complexe barytique, lequel est insoluble dans l'eau (le complexe barytique de l'inuline ne précipite facilement et complètement que par affusion

d'alcool). Ce complexe est ensuite décomposé par l'acide sulfurique et le fructoside est précipité de la solution à l'état de sirop hyalin, par l'alcool fort. (H. COLIN et A. DE CUGNAC [47], A. DE CUGNAC [6]).

C'est un corps très hygroscopique, non réducteur, de pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D = -47$ (COLIN et DE CUGNAC). Elle fond vers 199° . Elle est très soluble dans l'eau.

Les acides étendus l'hydrolysent le plus facilement. HCl centinormal la transforme complètement, en dix minutes, en sucre réducteur : on n'a pu trouver dans les produits d'hydrolyse autre chose que du fructose.

On sait peu de choses sur l'action des diastases sur ce produit. D'après MULLER, la diastase du malt l'hydrolyserait partiellement. On a reconnu depuis (COLIN et DE CUGNAC, *loc. cit.*) que l'amylase rigoureusement exempte de sucrase était sans action aucune.

Les autolysats de levure de boulangerie ne l'attaquent que péniblement, les autolysats de brasserie sont pour ainsi dire sans action.

L'échantillon de tricitine que nous avons utilisé avait été extrait par DE CUGNAC des rhizomes d'*Agropyrum* :

Solution de triticoside à 2 p. 100, 50 cm³.

Autolysat, levure de boulangerie (levure 1 p., eau 3 p.) 5 cm³, pH = 4,5 ; température : 37° ; antiseptique : toluène. Dosages sur 5 cm³ de solution.

Après —	mgr R —	R p. 100 —
8 jours	15,	20,4
20 jours	18,	24,5
45 jours	26,5	36,05
Inversion sur 5 cm ³	75,5	

Comme dans le cas de l'irisine, l'hydrolyse se poursuit à une vitesse extrêmement réduite pendant très longtemps, et, finalement, s'arrête avant que soit atteint le terme de l'hydrolyse.

L'*Aspergillus niger* a une action plus complète, bien que relativement lente.

La poudre d'A. *Oryzæ* est sans action aucune, et les autolysats de levure de brasserie agissent bien plus lentement encore que les autolysats de boulangerie.

Dans l'ensemble, l'action des produits fermentaires sur la tricitine et sur l'irisine est à peu près semblable.

GRAMININE

La graminine ressemble beaucoup par ses propriétés à la tricitine. Elle se prépare de la même façon à partir de l'Avoine à Chapelet (*Arrhenatherum bulbosum*). Son pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D = -44$, un peu inférieur à celui de la tricitine et son point de fusion est $+198^\circ$. Elle est très soluble dans l'eau.

Comme la tricitine, les acides étendus l'hydrolysent très facilement, mais elle diffère de ce polyoside en ce qu'elle est bien plus facilement que lui hydrolysée par les préparations de levure.

Après cinq jours de séjour à 37° , en présence d'un autolysat de levure de boulangerie d'activité moyenne, une solution de graminine donne :

Réducteur dosé sur 5 cm ³	77 mgr. 8
— — — (inversion acide)	77 mgr. 5

l'hydrolyse est donc totale.

Il va sans dire que les préparations d'*Aspergillus*

niger montrent une grande activité. Celles d'A. *Oryzæ* sont sans action.

2^e groupe. — Glucides ^{***} donnant à l'hydrolyse du fructose et un peu de glucose (glucofructosides).

PSEUDO-INULINE

La pseudo-inuline est souvent associée à l'inuline dans les produits qui la contiennent. On les sépare grâce à la différence de solubilité de leurs complexes barytiques (TANRET [2]). On peut aussi épuiser l'inuline brute (qui contient de la pseudo-inuline) par l'alcool à 60°. La pseudo-inuline est ensuite précipitée à l'état de composé barytique.

La pseudo-inuline fond vers 175° en se décomposant. Son pouvoir rotatoire spécifique est $[\alpha]_D = -32,2$. Par inversion acide, elle donne un mélange de glucose et de fructose de pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D = -85,6$. Elle est peu soluble dans l'eau froide, très soluble à chaud.

Celle que nous avons utilisée avait été extraite des racines de Chicorée, où elle est assez abondante.

La pseudo-inuline était également réputée infermen-tescible, non hydrolysée par les extraits de levure. En fait, l'autolysat de levure de boulangerie mène son hydrolyse à terme en deux à trois mois, comme il ressort des expériences suivantes :

1) Pseudo-inuline, solution à environ 2 p. 100 : 50 cm³ + autolysat de levure de boulangerie (levure 1 p., eau 3 p.) 5 cm³.

Le réducteur est dosé sur 5 cm³ de la liqueur et exprimé en p. 100 du réducteur total obtenu après hydrolyse acide.

Jours	Réducteur dosé	Réducteur p. 100
5	34,2	44,1
10	53,	68,4
15	62,7	80,5
20	65,5	84,5
25	70,	90,3
31	72,7	93,8
96	77,5	100,

II) Pseudo-inuline, solution à 1 p. 100: 50 cm³ + autolysat (levure de boulangerie 200 gr., H₂O 200 cm³ âgé de 10 mois) 5 cm³. Dosage sur 2 cm³.

Jours	Réducteur dosé	Réducteur p. 100
2	12,	35,
6	23,	67,2
5	28,	81,8
16	31,	90,6
25	33,7	98,5
Hydrolyse acide	34,2	

Les autolysats de levure de brasserie agissent également sur la pseudo-inuline, mais plus lentement.

Pseudo-inuline 2 p. 100 : 50 cm³ (autolysat levure de brasserie 2 p., eau 3 p., âgé de 7 mois) 5 cm³. Dosage sur 2 cm³.

Jours	Réducteur dosé	Réducteur p. 100
2	0,	0,
6	11,5	34,6
5	13,	39,1
16	20,	60,2
25	23,6	71,
Hydrolyse acide	33,2	

L'hydrolyse se poursuit et n'arrive que péniblement au terme. Bien entendu, les préparations d'*A. niger* hydrolysent complètement la pseudo-inuline en moins de deux jours.

Les préparations d'*A. Oryzæ* sont sans action, quel que soit le pH et la durée de l'hydrolyse.

ASPHODÉLOSIDE

L'asphodéloside a été retiré des tubercules d'Asphodèle et étudié de près par C. NEYRON [7] après un certain nombre d'auteurs qui, ayant surtout en vue les applications industrielles de la fermentation de ce corps, laissèrent un peu dans l'oubli la partie purement chimique de son étude.

H. COLIN et C. NEYRON [48] le préparent ainsi : les tubercules d'Asphodèles sont épuisés par diffusion aqueuse à 80°, puis le jus déféqué au plomb. Après concentration et élimination de l'excès de déféquant, on sature de baryte en poudre et on ajoute de l'alcool jusqu'à amener le titre à 25 p. 100. Le complexe barytique de l'Asphodéloside précipite. On le dissout dans l'eau tiède et on fait passer du gaz carbonique à refus dans la liqueur refroidie. On fait bouillir, on filtre et on élimine le baryum resté en solution par l'acide sulfurique. Il ne reste plus qu'à concentrer et à précipiter le fructoside par l'alcool. Le meilleur moyen de le purifier est, disent les auteurs, la dialyse, malgré les lourdes pertes qu'elle impose.

Après dessiccation dans le vide sulfurique et, pour finir, à l'étuve à 110°, l'asphodéloside pur se présente comme une poudre blanche, très hygroscopique, de

saveur légèrement sucrée, très soluble dans l'eau et l'alcool faible. Son point de fusion n'est pas net, comme c'est le cas, d'ailleurs, pour la plupart des fructosides : il foisonne vers 170° et fond brusquement vers 210°.

Son poids moléculaire est compris entre 700 et 900 et son pouvoir rotatoire spécifique entre — 18 et — 19 ; les acides l'hydrolysent très facilement et donnent un produit de pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D = -66$ à — 67 à la température de 15°, où prédomine le fructose, mais où existe un sucre aldéhydique, vraisemblablement du glucose, dans la proportion de 1 molécule pour 5 à 6 de fructose.

L'hydrolyse diastasique de ce gluco-fructoside, d'après C. NEYRON, offre plus de difficultés, exception faite bien entendu pour les préparations d'*A. niger*, liquide fermentaire et poudre mycélienne, qui l'hydrolysent très rapidement. Les préparations de sucrase, à partir de la levure de boulangerie, se montreraient moins actives et ne mèneraient pas l'hydrolyse à terme. Cependant, avec les autolysats aseptiques, nous avons constamment obtenu des hydrolyses complètes et assez rapides. Voici la marche de quelques-unes de celles que nous avons entreprises :

I) Solution d'asphodéloside à 2 p. 100 : autolysat (levure 200 gr. H²O 200 gr., 8 mois) 10 p. 100 en volume; antiseptique : toluène, pH = 4,5 ; température : 37°

Durée de contact	Prise d'essai	M gr R	R p. 100
2 jours 1/2	5 cm ³	84	71,4
10 jours	2 »	42	85,1
13 jours	2 »	43	87,0
21 jours	2 »	46	97,8
Inversion acide	2 »	47	

II) Solution d'Asphodéloside, 2 p. 100 environ ; autolysat (levure 200 gr., H²O 200 gr., 5 mois) 10 p. 100 en volume ; antiseptique : toluène, pH = 4,5 comme ci-dessus.

Durée de contact	Prise d'essai	Mgr R	R p. 100
7 jours	5 cm ³	87,	90,6
16 jours	5 »	93,5	97,4
29 jours	5 »	97,	100,
42 jours	5 »	97,	100,
Hydrolyse acide....	2 »	38,4	»

L'action des autolysats de levure de brasserie est plus lente, parfois incomplète, et se rapproche des résultats obtenus par C. NEYRON, surtout avec des autolysats peu « concentrés ».

La poudre d'A. *Oryzæ* agit sur l'Asphodéloside, mais son action est lente et incomplète : le glucide ne se laisse guère attaquer au delà de 70 p. 100.

Solution d'Asphodéloside à 2 p. 100 environ ; poudre d'A. *Oryzæ* 10 p. 100 en poids du sucre en solution, pH = 4,5 ; antiseptique : toluène ; température, 35-37°.

Durée de contact	Prise d'essai	Mgr R	R p. 100
8 jours	5 cm ³	34,4	29,6
16 jours	5 »	44,5	37,2
29 jours	5 »	52,3	43,9
42 jours	5 »	57,8	48,3
64 jours	5 »	65,3	54,6
7 mois et 9 jours....	2 »	34,3	71,7
Inversion acide	2 »	47,8	

Nous avons répété avec l'Asphodéloside les hydro-

lyses que nous avons effectuées avec l'inuline et un autolysat chauffé à 50°.

Nous avons employé le même autolysat chauffé à 50° pendant 1, 2, 3, 4, 5 et 24 heures ; les essais sont faits dans les conditions suivantes : Asphodéloside, solution à environ 3 p. 100, 10 cm³ ; autolysat ; antiseptique : toluène ; pH = 4,5 ; température : 37°.

Le réducteur est dosé sur 2 cm³ après 2 jours et après 15 jours.

Autolysat	Dosage après 2 jours		Dosage après 15 jours	
	Mgr R	R p. 100	Mgr	RR p. 100
Frais	38,6	80,4	48,	100,
Chauffé 1 heure....	38,6	80,4	48,	100,
» 2 »	35,4	73,7	47,	92,
» 3 »	32,7	68,1	46,4	96,
» 4 »	31,6	65,8	43,6	90,8
» 5 »	29,	60,4	44,5	92,7
» 24 »	15,	31,2	27,3	56,8
Inversion acide	48,	»	48,	»

Comme dans le cas de l'inuline, le réducteur décroît régulièrement dès la deuxième heure de chauffage, mais l'autolysat est encore actif sur l'asphodéloside après 24 heures de séjour à 50° et reste, même dans ces conditions, capable de mener l'hydrolyse à terme, bien qu'avec une vitesse réduite. Il semble donc que le traitement de l'autolysat par la chaleur, qui nous a déjà permis de séparer la saccharase de l'inulase, nous conduise encore ici à séparer l'inulase de la diastase hydrolysant l'asphodéloside.

FRUCTOSIDE D'*Hemerocallis*

Le fructoside que l'on retire des *Hemerocallis* ressemble beaucoup à l'asphodéloside. On l'extrait de la même façon. Vis-à-vis des liqueurs fermentaires que nous avons préparées, l'hémérocalloside se comporte à peu près comme l'asphodéloside, ce qui, entre autre, pourrait servir à rapprocher ces deux fructosides.

Expérience I. — Fructoside d'*Hemerocallis*, solution environ 2 p. 100 ; autolysat 7 (boulangerie) 10 p. 100 en volume ; pH = 4.5 ; antiseptique : toluène ; température 37°.

Durée du contact	Prise d'essai	Mgr R	R p. 100
7 jours	5 cm ³	46,	69,6
16 jours	5 »	54,	81,5
29 jours	5 »	57,2	86,3
42 jours	5 »	58,5	88,3
64 jours	5 »	62,	93,5
Inversion acide	5 »	66,25	

Les préparations d'*Aspergillus niger* mènent, bien entendu, l'hydrolyse au terme. Celles d'*Aspergillus Oryzæ* ont une action lente et incomplète.

Expérience II. — Fructoside d'*Hemerocallis*, solution environ 2 p. 100 ; poudre d'A. *Oryzæ*, environ 100 mgr. pour 10 cm³ ; antiseptique : toluène ; pH = 4,5 ; température 35-37°.

Durée du contact	Prise d'essai	Mgr R	R p. 100
8 jours	5 cm ³	14,5	22,7
16 jours	5 »	18,5	29,1
42 jours	5 »	28,5	44,7
64 jours	5 »	33,0	51,8
Inversion acide	5 »	63,7	

L'action des diastases est, on le voit, un peu plus lente que dans le cas de l'Asphodéloside.

SYNANTHRINE

La synanthrine a été découverte par TANRET [2] dans le tubercule du Topinambour. C'est un des quatre glucides qui voisinent avec l'inuline dans ce tubercule.

On la prépare en précipitant les fructosides par la baryte et en fractionnant les complexes formés à l'aide de leurs différences de solubilité dans l'alcool.

C'est un corps hygroscopique, très légèrement sucré. Son pouvoir rotatoire spécifique est $[\alpha]_D = -17$, le poids moléculaire que lui assignait TANRET = 1319 est sans doute trop fort, d'après les mesures cryoscopiques effectuées par COLIN et CHAUDUN [9]. Il fond à 170° .

La synanthrine contient, à côté du fructose, une assez forte proportion d'un aldose (17 p. 100 environ), qui a été identifié nettement comme glucose (COLIN et CHAUDUN, *loc. cit.*).

S'il est exact que les préparations habituelles de saccharase sont pour ainsi dire sans action sur la synanthrine (c'est d'ailleurs un moyen de séparer saccharose et synanthrine dans le suc de topinambour), il en est tout autrement des autolysats.

La petite quantité de synanthrine que nous possédions ne nous a pas permis de suivre l'hydrolyse, mais seulement de nous rendre compte que ce fructoside est très facilement hydrolysé par les autolysats de levure, aussi bien des levures de boulangerie que des levures de brasserie. Les préparations d'*A. niger* sont naturellement très actives, celles d'*A. Oryzæ* le sont très peu et ne donnent lieu qu'à des hydrolyses incomplètes.

LYCOROSIDES A et B

Ces deux glucides ont été isolés des oignons de *Lycoris Squamigera* Max. par H. BELVAL [8], qui les extrait par l'alcool fort et chaud : le fructoside A se sépare par refroidissement ; le fructoside B, soluble dans l'alcool, donne avec la baryte un complexe insoluble dans l'alcool. Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont — 34 pour le produit A, et — 19 pour le produit B. L'auteur fait en outre remarquer que les propriétés du fructoside B se rapprochent de celles de l'Asphodéloside de C. NEYRON. Nous avons étudié sur sa demande [8] l'hydrolyse de ces deux produits par les autolysats de levure :

Lycoroside A : 1 p. 100, 50 cm³ ; autolysat (levure de boulangerie 1 p., eau 1 p., âgé de 10 mois, 5 cm³) ; pH = 4,5 ; antiseptique : toluène ; température : 35-37°. Dosages sur 2 cm³.

Jours	R mgr	R p. 100
1	6,	35,3
3	11,	64,7
6	15,	88,2
14	16,5	97,0
Inversion acide sur 2 cm ³ ..	17,	

Lycoroside B : mêmes conditions que ci-dessus.

Jours	R mgr	R p. 100
3	15,4	80,
6	16,4	91,1
14	17,	96,4
Inversion acide sur 2 cm ³ ..	18,	

Les préparations d'*A. niger* sont, naturellement, très actives.

Nous pouvons donc ajouter aux observations de H. BELVAL que l'hydrolyse du fructoside B rappelle celle de l'Asphodéloside, ce qui pourrait jeter quelque lumière sur leur constitution.

*
**

Les faits que nous avons rassemblés dans ce chapitre nous contraignent encore à envisager deux sortes de liaisons entre fructoses, ou bien l'existence, dans les fructosides naturels, de deux isomères de ce même hexose. Comment expliquer autrement l'hydrolyse si facile du graminoside, à côté de la résistance de l'irisoside et du triticoside ?

Pour les glucides contenant un peu de glucose, on pourrait invoquer l'action de la saccharase, celle-ci étant définie depuis longtemps comme rompant la liaison glucose-fructose telle qu'elle existe dans le saccharose. Mais peut-on affirmer que ce soit cette liaison qui se trouve précisément dans les glucides en question ? En outre, les proportions relatives de glucose et de fructose nous obligent à envisager d'autres liaisons.

*
**

Dans un essai de classification provisoire des fructoholosides suffisamment connus dès à présent, H. COLIN et C. NEYRON [48] écrivent : « Toutes ces substances sont lévogyres, amorphes ou microcristallines, hygroscopiques à des degrés divers, plus ou moins solubles dans l'eau froide, très solubles dans l'eau chaude, insolubles dans l'alcool absolu.

« Leur pouvoir rotatoire après hydrolyse est, pour certaines, sensiblement égal à celui du fructose pur ; pour d'autres, il est notablement supérieur. C'est la seule ligne de démarcation que l'on puisse tracer, pour le moment, parmi ces substances. Encore n'est-elle pas absolument rigide.

« Dans le premier groupe se placent : Inuline, Irisine, Scilline, Graminine, Triticine et le glucide des caïeux d'ail. Ces divers corps sont assez fortement lévogyres. Exception faite pour la Graminine, ils ne fermentent pas sous l'action des levures ordinaires. Leurs composés barytiques sont peu solubles dans l'eau.

« Les lévulosides du second groupe sont beaucoup plus nombreux. Ils sont bien moins lévogyres que les précédents, ils fermentent assez facilement. Leurs complexes barytiques sont solubles dans l'eau et ne précipitent que par affusion d'alcool : synanthrine, hélianthénine, asphodéloside, hemerocallis, etc.; toutes ces substances paraissent renfermer du glucose, à titre de constituant moléculaire, on ne sait. »

La similitude entre les deux groupes établis par H. COLIN et C. NEYRON, et ceux que permet d'établir l'hydrolyse diastasique, tant par les autolysats de levures de boulangerie que les autolysats de levures de brasserie, est remarquable.

Aux caractères du premier groupe, on peut ajouter, Graminine mise à part, que ces différents glucides sont difficilement et souvent incomplètement hydrolysés par les autolysats de levure de boulangerie, et peu ou pas par les préparations de levure de brasserie.

Les glucides du second groupe, au contraire, sont facilement hydrolysés par les préparations de levure de

boulangerie, et plus difficilement par les autolysats de levure de brasserie.

*
**

Avant d'exposer, en même temps que les travaux les plus récents sur l'action possible de l'invertine dans des cas analogues à ceux que nous avons cités, les réflexions que nous ont suggéré nos résultats, nous voudrions dire un mot de l'hydrolyse de quelques sucres à base de fructose, par les mêmes préparations fermentaires qui nous ont servi jusqu'ici.

Le raffinose est une fructosido- α glucosido- β galactoside. D'après ce que l'on sait de l'action de l'invertine, la liaison fructose-glucose de ce glucide doit être tributaire de l'invertine. De fait, il en est bien ainsi. Il y a donc libération de fructose d'une part, de mélibiose d'autre part. Les préparations d'invertine hydrolysent-elles ou non le mélibiose ? Cela dépend de l'origine de la préparation envisagée, ce qui confirme la réserve que nous avons émise qu'il ne faut pas appliquer le terme invertine sans préciser le mode de préparation du ferment. Voici quelques exemples d'hydrolyses par des préparations d'« invertine » :

1) Autolysat de levure de boulangerie « Springer » (levure 1 p., eau 1 p., âgé de 10 mois, sous toluène). Raffinose 2 p. 100, 50 cm³ ; autolysat, 5 cm³ ; pH, environ 5 ; température 37° .

Dosages sur 2 cm³.

Jours	R mgr	R p. 100
1	20,5	65,7
2	21,	66,6
3	20,5	65,7
7	20,5	65,7
9	21,5	67,2
Inversion acide	31,5	»

Le résultat est indiscutable. Il n'y a pas eu hydrolyse du mélibiose.

II) Autolysat de levure de brasserie « Moritz » (levure 1 p., eau 3 p., âgé de 7 mois, sous toluène) ; mêmes conditions de pH et de température.

Jours	R mgr	R p. 100
1	30,	96,8
3	30,5	98,4
7	31,	100,
Inversion acide	31,	»

Cette fois, l'hydrolyse a été totale.

III) La liqueur fermentaire d'*A. niger* va un peu plus loin que le stade hydrolyse faible, que ce soit à la température ordinaire ou à 37°. On emploie la préparation à raison de 10 p. 100 en volume d'une solution de raffinose à 2 p. 100, pH environ 5.

Jours	Température du laboratoire		37°	
	R mgr	R p. 100	R mgr	R p. 100
1	5,	16,1	9,	29,
2	8,5	27,4	15,	48,3
3	18,	58,0	18,	58,0
5	19,5	62,9	21,	67,7
8	21,5	68,2	23,	74,2
12	»	»	25,2	81,2
Inversion acide	31,	»	31,	»

IV) La poudre d'A. *Oryzæ* (Takadiase) l'hydrolyse complètement. Nous l'employons à raison de 0 gr. 5 pour 50 cm³ de solution de raffinose à 2 p. 100; pH, environ 5.

Jours	R mgr	R p. 100
2	29,5	78,6
4	34,3	91,4
9	37,	98,7
Inversion acide	37,5	»

Voici donc quatre sources d'invertine : deux d'entre elles hydrolysent complètement le raffinose ; des deux autres, l'une est inactive sur le mélibiose, l'autre partiellement. On dira, suivant les idées en cours, que deux de ces invertines contiennent une mélibiase, les deux autres n'en possédant que peu, ou point.

*
**

Le mélézitose est un glucosido-fructosido-glucose. Il n'est pas réducteur et peut être hydrolysé de deux façons :

- 1) en glucose et turanose (hydrolyse faible) ;

2) en deux molécules de glucose et une de fructose (hydrolyse complète) ; l'étude des hydrolyses de ce polyose a été faite d'une façon très complète par M. BRIDEL et Th. AAGAARD [49] au mémoire duquel nous renvoyons pour tous les détails de la préparation à partir de la manne Alaghi. Nous avons suivi à la lettre le mode opératoire décrit par ces auteurs : épuisement à l'alcool froid à 80° pour enlever le saccharose, puis extraction à l'alcool bouillant. Nous avons recueilli 6 gr. de mélézitose, que nous avons caractérisé par son pouvoir rotatoire. L'action des produits fermentaires est bien ce qu'en ont dit M. BRIDEL et Th. AAGAARD. La sucrase est sans action, quelle que soit sa préparation, et les autolysats aseptiques, même très actifs sur le saccharose et l'inuline, sont sans action sur le mélézitose. Les préparations fermentaires d'*A. niger* provoquent l'hydrolyse en glucose et turanose ; les préparations de takadiastase, l'hydrolyse forte.

Il faut mentionner en outre l'action des autolysats de levure de brasserie : dans les premiers jours de l'auto-lyse, ces préparations montrent une certaine activité qui peut aller, pour des autolysats suffisamment concentrés, jusqu'à l'hydrolyse complète. Mais cette activité diminue graduellement et n'existe plus après un mois.

CHAPITRE III

SPECIFICITE DES FRUCTOSIDASES

A quels ferments attribuer ces diverses actions concernant les fructoholosides ? On pourrait, pour les expliquer, admettre l'existence, dans l'autolysat de levure, d'un certain nombre de diastases spécifiques, autant que de polyosides hydrolysés par ce milieu. Nous serions alors amenés à considérer dans l'autolysat, en plus de l'invertine proprement dite ou saccharase, une inulase, une pseudo-inulase, une asphodélosidase, etc., en tout une quinzaine de ferments spécifiques, sans préjudice de ceux que l'on pourra ultérieurement ajouter à la liste.

Si l'on s'en tient à la méthode de comparaison pour distinguer ces ferments et s'assurer de leur spécificité, il n'est pas douteux que l'on soit amené à admettre l'existence d'une hydrolase spécifique pour chaque polyose, même en opérant sur des sucres voisins par leur constitution. On pourra le plus souvent trouver, en faisant varier les conditions d'expérience, un milieu hydrolysant l'un sans toucher l'autre.

C'est Emil FISCHER [50] qui, le premier, émit l'idée de

diastase spécifique non d'un corps, mais d'un groupe de corps présentant des liaisons identiques. Si la diastase est la clé qui s'adapte à la serrure, elle doit ouvrir toutes les serrures présentant la même disposition, tous les sucres présentant la même configuration stéréochimique.

En 1903, H. POTTEVIN [51] fournit, dans cet ordre d'idées, une classification des glucides en accord avec les idées de FISCHER. Il remarqua que l'invertine hydrolyse le saccharose, le raffinose et le gentianose ; que la maltase hydrolyse le maltose, le tréhalose, les *d*-glucosides α , et, partiellement, l'amygdaline. L'émulsine agit sur de nombreux *d*-glucosides β , etc... « Chaque diastase, dit-il, agit sur un type stéréochimique déterminé. Il est très naturel d'admettre que cela tient précisément à ce qu'elle est bâtie elle-même sur un type homologue. »

La méthode de comparaison devait nécessairement infirmer cette théorie. On trouvait facilement des milieux hydrolysant un ou plusieurs glucides d'un groupe sans toucher aux autres, ce qui prouve qu'autre chose intervient que la liaison glucosidique elle-même.

Cependant, de temps à autre, quelques auteurs reprennent l'idée de POTTEVIN, plus ou moins ouvertement. La spécificité de l'invertine — le ferment le plus utilisé — est assez souvent mise en doute. GIAJA [13], en 1909, comparant les hydrolyses du saccharose et du raffinose par l'invertine, avait posé la question de la multiplicité des invertines : raffinose et saccharose étaient tributaires des préparations de levure, mais certaines invertines hydrolysant parfaitement le saccharose restaient sans action sur le raffinose. La macération aqueuse de muqueuse intestinale de chien, différents sérums (cheval, mouton, carpe, etc.) sont dans ce cas.

Or, dans le raffinose, le fructose est attaché au glucose de la même façon que dans le saccharose, puisqu'il est facile de retirer le saccharose lui-même du raffinose (comme d'ailleurs du gentianose). On se trouve donc en présence de la même liaison glucosidique et bien obligé de conclure que la liaison glucosidique n'intervient pas seule, sans que l'on puisse préciser de quelle façon le reste de la molécule affecte la réaction.

Il n'en est pas moins vrai que l'hydrolyse faible du raffinose consiste à détacher une molécule de fructose avec mise en liberté de mélibiose. De même, dans l'hydrolyse du gentianose et du stachyose (H. BIERRY et G. BARTHET [12] l'invertine détache une molécule de fructose en libérant gentiobiose et manninotriose. Il semblait donc logique (H. BIERRY) d'attribuer à un ferment unique, distinct de l'invertine, le détachement de cette molécule de fructose, et BIERRY proposa le nom de « lévulopolyase » [11].

Ce sont ces considérations, et aussi le fait que certaines préparations, actives sur le saccharose et inactives sur le raffinose, sont actives sur le mélézitose, qui conduisirent KUHN et MUNCH à distinguer deux saccharases : fructosaccharase et glucosaccharase, qui doivent détacher l'une le fructose et l'autre le glucose, là où ils se trouvent sous la même forme que dans le saccharose [52]. Cependant, quelques années plus tôt KUHN et WILLSTAETTER [53] avaient démontré que raffinase et saccharase sont deux diastases différentes, en se basant sur les vitesses d'inversion du saccharose et du raffinose, qui, toutes choses égales d'ailleurs, sont différentes.

Quelques années plus tard, H. COLIN et A. DE

CUNAC [47] hydrolysent à l'aide de la sucrase d'authentiques holofructosides comme la graminine, et la question de la spécificité de l'invertine se pose à nouveau. Est-ce l'invertine (la saccharase) qui hydrolyse la graminine, ou y a-t-il, dans l'autolysat de levure, une fructosidase responsable de cette action ? S'agit-il encore de la lévulopolyase de BERRY (la fructosaccharase de KUHN et MUNCH) ?

A peu près à la même époque, M^{me} GRUZEWSKA [54, 55, 56]), puis H. COLIN et P. RICARD [57] étudient l'action de la sucrase sur le laminaroside. Cet authentique hologlucoside est, lui aussi, hydrolysé par certaines préparations d'invertine et, en particulier, par la macération de levure préalablement desséchée et broyée selon la technique de BOURQUELOT. Ici non plus, il ne peut être question de liaison glucose-fructose. Sommes-nous en présence de la gluco-saccharase ?

L'existence de ces deux saccharases expliquerait évidemment bien des choses. Mais dans ce cas, que devient l'invertine ?

Le travail de Rudolf WEIDENHAGEN jette quelque lumière sur cette question. Cet auteur admet, d'après KUHN, que l'hydrolyse du saccharose peut être effectuée indifféremment par deux enzymes distincts qu'il nomme α -glucosidase et β -h-fructosidase (1).

Voici, en substance, sur quoi repose cette « théorie des deux ferments » : KUHN et MUNCH, ayant examiné les actions inhibitrices de diverses substances sur l'hydrolyse du saccharose, arrivèrent à cette conclusion que le glucose d'une part, et le fructose d'autre part, retar-

(1) Il s'agit de la diastase qui s'attache au fructose instable ou γ fructosidase.

dent l'inversion du saccharose par la sucrase de levure, tandis que le glucose est seul à gêner l'hydrolyse du même oside par l'invertine d'*Aspèrgillus Oryzæ* (takadiastase), le fructose n'exerçant aucune action retardatrice (KUHN et MUNCH [52]). Ils en déduisent que, suivant son origine, le ferment se porte soit sur le fructose, soit sur le glucose, et que, dans ces conditions, il est nécessaire d'admettre non plus un seul enzyme capable d'hydrolyser le saccharose, mais deux, l'un s'attachant au glucose et l'autre au fructose.

WEIDENHAGEN [58] propose de distinguer ces deux ferments par leur comportement vis-à-vis du raffinose et du mélézitose. Pour ce qui est de l'hydrolyse du premier, l' α -glucosidase est inactive, tandis que la fructosidase en provoque l'hydrolyse faible (fructose et mélibiose). De même, les invertines caractérisées comme α -glucosidases hydrolyseront totalement le mélézitose.

Ces deux ferments ont un pH optimum très différent : 4,7 pour la fructosidase ; 7,0 pour la glucosidase. La réaction du milieu permet ainsi de les séparer. De plus, l'auteur a réussi à les isoler, dans un extrait aqueux de levure basse, par adsorption sur alumine B et élution dans une solution de phosphate monopotassique [59].

Cette façon de voir tend à bouleverser les idées actuelles sur les diastases. En particulier, le terme invertine perd son sens. La maltase devient une simple α -glucosidase et WEIDENHAGEN [60] démontre qu'il n'y a pas lieu de distinguer, comme LEIBOWITZ [61], deux sortes de maltases « glucomaltase » et « glucosidomaltase », suivant que le ferment s'attaque au glucose réducteur du maltose ou au glucose glucosidifié. La séparation, par WILLSTAETTER et BAMANN, de la maltase

et de la saccharase, revient d'après le même auteur, à séparer glucosidase et fructosidase [61].

La notion d'enzyme spécifique est ainsi très amoindrie.

WEIDENHAGEN admet seulement trois types de spécificités, qui sont les suivants :

1^{er} type : structural (glucosidase et galactosidase);

2^e type : stéréochimique (α et β -glucosidases);

3^e type : cyclique (dépendant de la place du pont d'oxygène : β -*h*-fructosidase et α -*n*-glucosidase).

Cette nouvelle classification réduit considérablement le nombre des diastases (WEIDENHAGEN [62]).

Pour confirmer ses vues, WEIDENHAGEN passe en revue un certain nombre d'hydrolyses. La β -glucosidase existant dans la levure haute, hydrolyse l'amygdalosite (WEIDENHAGEN [63]); le cellobiose est aussi tributaire du même enzyme, mais l'identité de la cellobiase et de la salicosidase est difficile à prouver (1) (WEIDENHAGEN [66]). La fructosidase, qui hydrolyse saccharose, raffinose et stachyose, doit aussi hydrolyser l'inuline, mais l'hydrolyse de cet holofructoside est 7.500 fois moins rapide que celle du saccharose [67]. Il résulte de ces faits qu'un grand nombre de termes perdent leur sens : maltase, tréhalase, raffinase, inulase deviennent qui une glucosidase, qui une fructosidase, spécifiques seulement d'une liaison.

Bien que séduisante par sa simplicité, cette façon de voir est souvent en contradiction formelle avec les résultats acquis par la méthode de comparaison. Les différences de comportement de deux enzymes présumés

(1) On connaît d'ailleurs sur ce sujet les beaux travaux de G. Bertrand et de ses collaborateurs [64, 65] (Réf. bibliogr.).

identiques, provenant ou non de sources différentes, sont-elles conciliables avec une simplification aussi radicale ? Le pH optimum peut varier, les vitesses d'hydrolyse aussi, et parfois considérablement. WEIDENHAGEN répond à cela, notamment au sujet de la maltase, qui, on le sait, présente suivant son origine des écarts importants de pH optimum (voir H. COLIN, *Les Diastases*, t. I, p. 140) : « Le fait que la maltase, dit-il, suivant le milieu fermentaire, peut manifester son maximum d'activité à différents pH ne peut pas contredire l'identité de l'enzyme dans ces différents cas. » Les différences observées seraient l'effet de substances activantes ou inhibitrices. Evidemment, il ne convient pas de parler d'un produit fermentaire comme d'un enzyme pur, ce dernier nous étant, du moins jusqu'à présent, totalement inconnu.

La question est de savoir si c'est à l'enzyme lui-même, dans ce qu'il a d'essentiel, ou seulement à l'ambiance, qu'il faut rapporter les différences de comportement des différents milieux fermentaires à l'égard de corps qui ont la même liaison glucosidique. Il est bien difficile de se prononcer là-dessus tant qu'on ignorera la nature de l'enzyme.

On peut dire tout d'abord qu'une grande variété de structure peut s'accomoder des mêmes liaisons glucosidiques. WEIDENHAGEN ne le nie pas, mais il ne voit là qu'une cause de différence dans les vitesses d'hydrolyse.

Nous avons relaté d'autre part comment on peut préparer un milieu fermentaire actif sur le saccharose et inactif sur l'inuline. Dans l'hypothèse où les deux corps sont tributaires de la même fructosidase (celle qui s'attaque au fructose instable), il faut dire que l'ambiance

seule est responsable, sans pouvoir dire d'ailleurs quelle modification de détail la chaleur a fait subir au milieu pour supprimer son pouvoir hydrolysant sur un seulement des deux corps tributaires auparavant de son action.

Cependant, le fait de considérer une liqueur diastasique comme un produit pur, défini, conduit à établir des distinctions inexistantes entre les diastases. C'est là surtout, nous semble-t-il, le plus gros argument en faveur des théories de WEIDENHAGEN.

Qu'il existe des familles de corps tributaires du même enzyme ou d'enzymes très voisins, la chose n'est pas douteuse ; l'ensemble de ce travail en fait la preuve. Il est bien certain que du point de vue de leur hydrolyse diastasique des sucres tels que saccharose, raffinose et les divers fructosanes, sont tributaires sinon du même enzyme, du moins d'enzymes très voisins. Mais les vues trop absolues de WEIDENHAGEN semblent en défaut sur quelques points. Par exemple :

1° La poudre d'A. *Oryzæ*, que l'on donne comme type des gluco-saccharases, hydrolyse le raffinose. C'est, dit WEIDENHAGEN [68] que la takadiastase contient la β -*h*-fructosidase. Comment expliquer alors que la même préparation soit inactive sur l'inuline et sur les autres fructosanes ? Si l'on réplique que la takadiastase attaque le raffinose par l'extrémité galactose, nous serons alors amenés à mettre dans ce produit une galactosidase. On peut également ajouter que l'identité des fructoses du raffinose et de l'inuline est loin d'être prouvée. Nous reviendrons sur ce point.

2° La même préparation de takadiastase hydrolyse à la perfection la laminaroside, comme le fait l'autolysat

de levure de boulangerie par ailleurs inactif sur le maltose. Il semble alors que l'autolysat de levure contienne une glucosidase différente de la glucosidase α . On ne possède actuellement aucun renseignement sur la structure du glucose constituant la molécule de laminaroside, mais le fait que l'émulsine n'agit pas sur ce produit semble exclure la possibilité d'y rencontrer du glucose β . Il faudra bien alors invoquer les raisons de structure capables d'expliquer soit l'inertie des diastases vis-à-vis du maltose, soit l'action sur le lamimaroside des produits inactifs sur le maltose. Les acides étendus, d'ailleurs, hydrolysent moins facilement le maltose que le saccharose et le tréhalose est encore bien plus résistant. Cette résistance à l'hydrolyse tient sans doute pour une bonne part à une raison de structure.

3° L'autolysat de levure chauffé n'hydrolyse plus l'inuline, mais hydrolyse encore le saccharose et les glucosides. Nous sommes bien encore obligés de mettre en doute ici l'identité du ferment qui hydrolyse ces deux fructosides. Mais, nous l'avons fait remarquer plus haut, la nature du fructose constituant l'inuline nous est encore inconnue. On n'est même pas d'accord sur la présence ou l'absence du glucose dans la molécule.

Si le fructose de l'inuline n'est pas identique à celui du saccharose, nous admettrons une autre fructosidase dans l'autolysat.

On peut penser, d'autre part, que l'hydrolyse s'effectue en deux temps sous l'influence de deux diastases différentes et que la suppression de l'un des enzymes entraîne l'inactivité de l'autre, comme c'est le cas pour l'hydrolyse de l'amidon. Nous avons montré, au chapitre

précédent, que les arguments absolument certains font défaut à cette manière de voir.

4° Les hydrolyses partielles vont encore à l'encontre des vues de WEIDENHAGEN. Nous avons énuméré les explications que l'on pouvait fournir de ces arrêts observés dans maintes hydrolyses et, en définitive, il semble bien qu'il faille avoir recours, là encore, à des considérations d'architecture moléculaire.

En résumé, pour les polyoses relativement simples : bioses, trioses, tétroses, et pour les glucosides, dont la constitution nous est connue, la théorie proposée par WEIDENHAGEN est en bon accord avec les faits. Les rares exceptions que nous avons relevées peuvent trouver une explication dans la façon dont le milieu fermentaire est affecté par la nature du sucre en cause. Notre ignorance à peu près totale de la façon dont l'enzyme se porte sur le sucre doit, cependant, nous inciter à la prudence.

Pour les polyoses plus complexes, dont la composition comme la structure intime nous est le plus souvent mal connue, nous trouvons à chaque instant de graves contradictions entre la théorie proposée et les idées actuelles sur la constitution de ces corps.

CONCLUSIONS

1° Les autolysats aseptiques de levure de boulangerie hydrolysent outre le saccharose, tous les fructosanes décrits jusqu'alors : l'inuline, la graminine, l'irisine, la triticine, la pseudo-inuline, l'asphodéloside, la synanthrine, les lycorosides A et B, le fructoside d'*Hemerocallis*.

2° Le pouvoir hydrolysant d'un autolysant vis-à-vis de l'inuline est variable, suivant son mode de préparation. Nous avons pu établir que :

a) les autolysats concentrés ont, seuls, une action nette et généralement complète ;

b) le pouvoir hydrolysant vis-à-vis de l'inuline est fonction de la durée de l'autolyse. Il est presque nul au début de celle-ci ;

c) la nature de l'antiseptique employé au cours de la préparation de l'autolysat affecte les résultats de l'hydrolyse. Le fluorure de sodium et le toluène ont une action favorisante. Le chloroforme a une action nettement empêchante ;

d) la température exerce également une action importante. Aux environs de 0°, la production d'inulase est accrue, à 37° elle est atténuée ;

A 50°, l'autolysat perd toute propriété hydrolysante

vis-à-vis de l'inuline. Par contre, la saccharase n'est pas altérée ;

Abandonnés à la putréfaction, les autolysats les plus actifs sur l'inuline perdent rapidement la propriété de l'attaquer. La saccharase, au contraire, résiste à la putréfaction ;

e) Les propriétés des autolysats varient considérablement avec l'origine des levures mises en œuvre. D'une façon générale, les levures actuelles de brasserie (telles que la levure MORITZ) sont bien moins actives que les levures de boulangerie, mais parmi celles-ci il existe encore de très grandes différences.

3° L'hydrolyse de l'inuline a lieu pour le mieux dans les conditions suivantes : $pH = 4,5$; température 37° . Néanmoins, elle se produit encore à la température ordinaire, mais bien plus lentement. A $pH = 7,0$ toute hydrolyse est suspendue.

4° Le fructose et le glucose retardent l'hydrolyse de l'inuline, qui peut cependant être menée à terme en présence de ces sucres. Le fructose a une action plus marquée que le glucose.

5° Le chlorure de sodium, le phosphate trisodique, le phosphate monosodique, le citrate de soude, le liquide fermentaire d'*A. niger* bouilli, ajoutés à la dose de 0,0 2 p. 100 n'ont aucune action sur l'hydrolyse.

6° Il n'existe pas de maximum utile de ferment, en ce qui concerne l'hydrolyse de l'inuline par l'autolysat de levure de boulangerie. Tout se passe comme dans l'hydrolyse de l'amidon : la proportion de réducteur formé croît linéairement ou presque, quand on augmente soit la quantité de sucre, soit la quantité de liqueur diastasique.

7° L'autolysat de levure de brasserie hydrolyse incomplètement l'inuline. Les préparations fermentaires à partir de l'*A. Oryzæ* (takadiastase) et du mucor BOULARD sont inactives.

8° Il arrive assez fréquemment que l'hydrolyse de l'inuline soit incomplète, surtout avec les autolysats tant soit peu affaiblis. On peut cependant la faire progresser par addition soit d'inuline fraîche, soit de liqueur diastasique fraîche. Aucune explication certaine ne peut être donnée à ces faits.

9° Les glucides qui, comme l'asphodéloside, donnent à l'hydrolyse à la fois du fructose et du glucose, sont hydrolysés rapidement et complètement par les autolysats.

Ceux qui ne livrent que du fructose à l'hydrolyse, comme la triticine et l'irisine, sont attaqués avec lenteur et l'hydrolyse est incomplète, exception faite pour la graminine, qui s'hydrolyse facilement.

10° Le raffinose subit l'hydrolyse faible sous l'action des autolysats à inulase. Le mélézitose n'est pas touché, mais ce dernier oside est hydrolysé complètement par les préparations d'*A. Oryzæ*.

11° Il est possible que l'hydrolyse des divers fructosides que nous avons étudiés soit le fait d'une seule et même fructosidase ; mais il est difficile d'admettre, comme le fait WEIDENHAGEN, que cette fructosidase est la même que celle qui hydrolyse le saccharose.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. J.-R. GREEN: Sur la germination du tubercule d'artichaut de Jérusalem. — *Ann. of Botany*, 1, p. 223 (1888).
2. C. TANRET: Sur l'inuline. — *Bull. Soc. Chim.*, 3^e série, 9, pp. 200, 227, 622 (1893).
3. M. BOURQUELOT: Recherches sur les propriétés physiologiques du maltose. — *Journ. Anat. Physiol.*, p. 193 (1886).
4. H. COLIN: Action de la sucrase sur les satellites de l'inuline. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 2, p. 157 (1920).
5. A. AUGEM: Les hydrates de carbone des iris. Nature, genèse et transformations. — *Rev. Gén. Bot.*, 40, pp. 456, 537, 591 (1928).
6. A. DE CUGNAC: Recherches sur les glucides des graminées. — *Thèse Sc. Nat.* Paris, 1930.
7. C. NEYRON DE MEONS: Le glucide lévogyre des asphodèles. — *Thèse Doct. Univ.* Paris, 1930.
8. H. BELVAL: L'amidon et les fructosides des lycoris. — *Rev. Gén. Bot.*, 45, p. 213 (1933).
9. COLIN et M^{lle} A. CHAUDUN: Composition de la synanthrine de Tanret. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 15, p. 402 (1933).
10. J. CARLES: Chimisme et classification chez les iris. — *Thèse Sc. Nat.* Paris, 1934.
11. H. BIERRY: Invertines et lactases animales. Leur spécificité. — *C. R. Ac. Sc.* 148, p. 119 (1907).
12. G. BARTHET et H. BIERRY: Sur la digestion des hexotrioses. — *C. R. Soc. Biol.*, 64, p. 651 (1908).
13. GIAJA: Hydrolyses diastasiques du saccharose et du raffinose. — *Thèse Sc. Nat.* Paris, 1909.
14. V.-H. YOUNG: Quelques facteurs affectant la formation d'inulase dans *Aspergillus niger*. — *Plant World*, 21, pp. 75 et 114 (1918).
15. M. BOURQUELOT: Sur un ferment soluble dédoublant le tréhalose. — *C. R. Ac. Sc.*, 116, p. 826 (1893).
16. M. HOLDERER: Influence de la réaction du milieu sur la filtration des diastases. — *C. R. Ac. Sc.*, 149, p. 1153 (1909).

17. H. COLIN: L'inuline chez les végétaux. — *Rev. Gén. Bot.*, 31, p. 75 et suivantes.
18. M. BOURQUELOT: Recherche dans les végétaux, du sucre de canne à l'aide de l'invertine et des glucosides à l'aide de l'émulsine. — *C. R. Soc. Biol.*, 53, p. 909 (1901).
19. J. WOLFF et B. GESLIN: Dégradation de l'inuline dans la racine de chicorée. — *Ann. Inst. Pasteur*, 32, p. 71 (1913).
20. H. COLIN et M^{lle} A. CHAUDUN: Action inhibitrice de certains produits sur l'hydrolyse diastasique du saccharose. — *Journ. Chim. Phys.*, 28, p. 546 (1931).
21. H. VON EULER et K. JOSEPHSON: Sur la spécificité des enzymes. — *Z. Physiol. Chem.*, 166, p. 274 (1927).
22. ACHALME: Electronique et Biologie, chap. 35, p. 541.
23. M. MASCRÉ et R. PARIS: Action du formol sur l'émulsine et l'invertine. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 17, p. 519 (1935).
24. M^{lle} A. CHAUDUN: Hydrolyse diastasique du saccharose en présence de formol. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 17, p. 519 (1935).
25. SCHMID et BECKER: Cryoscopies dans l'ammoniac liquide. — *Ber Chem. Gesell.*, 58, pp. 1968-1971 (1925).
26. REILHEN et NESTLE: Sur la détermination des poids moléculaires dans l'ammoniac liquide. — *Ber Chem. Gesell.*, 59, p. 1159 (1926).
27. PRINGSHEIM, REILLY et DONOVAN: Sur l'inuline (8^e comm.). — *Ber Chem. Gesell.*, 62, p. 2378 (1929).
28. L. SCHMID et L. HASCHEK: Détermination du poids moléculaire du sucre et de l'inuline dans l'ammoniac liquide. — *Monatsh.*, 59, p. 328 (1932).
29. L. SCHMID et R. FALKE: Mesure de la viscosité des solutions de glucides dans l'ammoniac liquide, la formamide et l'eau. — *Monatsh.*, 59, pp. 357-380 (1932).
30. SCHMID et ZACHERL: Mesures de conductibilité dans l'ammoniac liquide. — *Monatsch.*, 53-54, p. 498 (1929).
31. DREW et HAWORTH: La structure moléculaire de l'inuline. — *Journ. Chem. Soc.*, p. 2690 (1928).
32. JACKSON et MAC DONALD: Deux nouveaux anhydrides de —difuctose cristallisés, à partir de l'inuline hydrolysée. — *Bur. of Stand. Journ. Research.*, 6, p. 709 (1931).
33. M. BOURQUELOT et M. BRIDEL: Application de la méthode biochimique de recherche du glucose à l'étude des produits de l'hydrolyse fermentaire de l'inuline. — *C. R. Ac. Sc.*, 172, p. 946 (1931).
34. SCHLUBACH et KNOOP: Polyvélanes naturels. Hydrates de carbone de l'artichaut de Jérusalem. — *Annalen*, 497, p. 208 (1932).

35. PRINGSHEIM et OHLMEYER: Inuline et inulinase. — *Ber. Chem. Gesell.*, 65 B, pp. 1242-1248 (1932).
36. VOGEL et PICTET: Dépolymérisation de l'inuline. — *Helv. Chem. Acta*, 11, p. 215 (1928).
37. BERNER: Sur la dépolymérisation supposée de l'inuline. — *Ber. Chem. Gesell.*, 63, p. 1356 (1930).
38. PRINGSHEIM, REILLY, HENSEL, BURMEISTER, DONOVAN et Miss HAYES: Sur l'inuline, 10^e mémoire. — *Ber. Chem. Gesell.*, 63, p. 2636 (1930).
39. BERNER: Seconde communication sur la dépolymérisation supposée de l'inuline. — *Ber. Chem. Gesell.*, 64, p. 842 (1931).
40. SCHLUBACH et FLORSHEIM: Constitution de la sinistrine. — *Ber. Chem. Gesell.*, 62, p. 1492 (1929).
41. SCHLUBACH et ELSSNER: Sinistrine A (diléthane) produit de dégradation de l'inuline. — *Ber. Chem. Gesell.*, 63, p. 362 (1930).
42. JACKSON et GOERGEN: Individualité de l'anhydrofructose et de l'anhydride de difructose. — *Bur. of Stand. Journ. Research.*, 5, p. 733 (1930).
43. IRVINE et STEVENSON: La structure moléculaire de l'inuline. Isolement d'un nouvel anhydrofructose. — *Am. Chem. Soc.*, 51, p. 2197 (1929).
44. JACKSON et MAC DONALD: Présence constante de disaccharides non réducteurs dans l'inuline hydrolysée. — *Bur. of Stand. Research.*, 5, p. 1151 (1930).
45. H.-H. SCHLUBACH et F. ELSSNER: La synthèse du noyau de base de l'inuline. — *Ber. Chem. Gesell.*, 61, p. 2358 (1928).
46. HAWORTH et LEARNER: La structure de l'inuline. — *Journ. Chem. Soc.*, 131, p. 619 (1928).
47. H. COLIN et A. DE CUGNAC: Les lévulosanes des graminées: graminine et triticine. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 8, pp. 621-630 (1926).
48. H. COLIN et C. NEYRON: La glucide lévogyre des asphodèles. — *Bull. Soc. Chim.*, 49, p. 1542 (1931).
49. M. BRIDEL et Th. AAGAARD: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 9, pp. 884-907 (1927).
50. E. FISCHER: Influence de la configuration sur l'action des enzymes. — *Ber. Chem. Gesell.*, 27, p. 2985 (1894).
51. H. POTTEVIN: Influence de la configuration stéréochimique des glucosides sur l'activité des diastases hydrolytiques. — *Ann. Inst. Pasteur*, 17, p. 33 (1903).
52. KUHN et MUNCH: Sur la gluco et la fructo-saccharase. — *Z. Physiol. Chem.*, 150, pp. 220-242 (1925).

53. R. KUHN et R. WILLSTAETTER: Sur la nature spécifique de la saccharase et de la raffinase. — *Z. Physiol. Chem.*, **115**, p. 180 (1921).
 54. M^{me} Z. GRUZEWSKA: Contribution à l'étude de la laminarine du *Laminaria flexicaulis*. — *C. R. Ac. Sc.*, **170**, p. 521 (1920).
 55. M^{me} Z. GRUZEWSKA: L'action des diastases sur la laminarine. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **3**, p. 490 (1921).
 56. M^{me} Z. GRUZEWSKA: Quelques propriétés physico-chimiques de la laminarine. — *Bull. oc. Chim. Biol.*, **5**, p. 216 (1923).
 57. H. COLIN et P. RICARD: Préparation et propriétés de la laminarne (laminaroloside) de *Laminaria flexicaulis*. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **12**, p. 88 (1930).
 58. R. WEIDENHAGEN: Hydrolyse diastasique du saccharose. — *Z. d. Ver. Deut. Zucker Ind.*, **78**, p. 781 (1928).
 59. R. WEIDENHAGEN: Séparation de l' α -glucosidase et de la β -fructosidase dans les autolysats de levure. — *Z. d. Ver. Deut. Zucker Ind.*, **80**, pp. 155-165 (1930).
 60. R. WEIDENHAGEN: Spécificité de l'hydrolyse diastasique du maltose. — *Z. d. Ver. Deut. Zucker Ind.*, **78**, pp. 788-795 (1928).
 61. J. LEIBOWITZ et P. MECHLINSKI: Sur la takamaltase et la taka-saccharase. Contribution à l'étude de la spécificité des disaccharases. — *Z. Physiol. Chem.*, **154**, pp. 64-84 (1926).
 62. R. WEIDENHAGEN: La spécificité et le mécanisme d'action des hydrolases. — *Fermentforschung*, **11**, p. 154 (1930).
 63. R. WEIDENHAGEN: β -glucosidase; 1, hydrolyse de l'amygdaline. — *Z. d. Ver. Deut. Zucker Ind.*, **79**, p. 591 (1929).
 64. G. BERTRAND et M. HOLDERER: Recherches sur la cellase, nouvelle diastase dédoublant le cellose — *Ann. Inst. Pasteur*, **24**, p. 180 (1910).
 65. G. BERTRAND et A. COMPTON: Recherches sur l'individualité de la cellase et de l'émulsine. — *Ann. Inst. Pasteur*, **24**, p. 931 (1910).
 66. R. WEIDENHAGEN: β -glucosidase; II, hydrolyse du cellobiose. — *Z. d. Ver. Deut. Zucker Ind.*, **80**, p. 11 (1930).
 67. R. WEIDENHAGEN: Hydrolyse diastasique de l'inuline. — *Naturwissenschaften*, **20**, p. 254 (1932).
 68. R. WEIDENHAGEN: Nature spécifique de l'invertase. — *Z. d. Ver. Deut. Zucker Ind.*, **78**, p. 406 (1928).
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
I. — TECHNIQUES	11
II. — PRÉPARATION DES PRODUITS FERMENTAIRES....	15
1) Autolysats de levure	15
Influence des conditions d'autolyse : concen- tration	16
Durée d'autolyse	17
Antiseptiques et température d'autolyse...	19
Origine de la levure	23
2) Produits mycéliens	24
<i>Aspergillus niger</i>	24
<i>Aspergillus Oryzæ</i>	25
III. — HYDROLYSE DIASTASIQUE DES FRUCTOSIDES....	27
1) L'inuline	27
Préparation	27
Hydrolyse par les autolysats de levure....	30
Influence du pH	33
Influence de la température.....	34
Influence des produits d'hydrolyse.....	38
Action de quelques sels à petite dose.....	40
Influence des concentrations relatives de l'inuline et du ferment	41
Action de quelques autres milieux ferment- taires	44
Hydrolyses incomplètes	47

2) Fructo-polyosides	57
1 ^{er} Groupe : Glucides ne fournissant pas à l'hydrolyse que du fructose....	58
Irisoside (Irisine)	58
Triticoside (Triticine)	61
Graminoside (Graminine)	63
2 ^e Groupe : Glucides fournissant à l'hy- lyse du fructose et un peu de glucose	64
Pseudo-inuline	64
Asphodéloside	66
Fructoside d' <i>Hemerocallis</i>	70
Synanthrine	71
Lycorosides A et B	72
Raffinose	75
Mélézitose	77
IV. — SPÉCIFICITÉ DE L'INVERTINE	79
V. — CONCLUSIONS	89
VI. — INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	93

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Mutarotation des sucres

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 15 Mai 1936.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Ch. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

